

EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE
Calendula officinalis L. MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN Y
CALENTAMIENTO ÓHMICO ASISTIDO POR HIDRODESTILACIÓN.

OLGA ISABEL SARMIENTO PÉREZ

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

DUITAMA

2016

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL
DE *Calendula officinalis* L. MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN Y
CALENTAMIENTO ÓHMICO ASISTIDO POR HIDRODESTILACIÓN.**

OLGA ISABEL SARMIENTO PÉREZ

**Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniera de
alimentos**

**Directora:
GOLDA MEYER TORRES VARGAS
Química de alimentos**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
DUITAMA**

2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Duitama, _____ de 2016.

AGRADECIMIENTOS

*“Doy gracias a Dios por la vida y permitirme culminar este proyecto,
a mis padres por su apoyo, acompañamiento en los
momentos difíciles, por las palabras de aliento que no me
dejaron desfallecer, a ellos les dedico este trabajo
por su cariño y amor incondicional.*

*A mi directora de tesis Golda Meyer Torres por su ayuda, disponibilidad,
orientación y colaboración en cada una de las etapas
de elaboración de este trabajo.*

*Al cuerpo docente de la universidad nacional
abierta y a distancia (UNAD) Cead Duitama,
el ing Osvaldo Guevara, la ing. Ruth Isabel Ramirez
y el ing. Freddy por sus orientaciones y colaboración.*

*A todas las personas (amigos y familiares) que me apoyaron, me enviaron sus buenos
deseos
y que hicieron posible que culminara con éxito esta etapa de mi vida”*

A todos mis más sinceros agradecimientos.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
INDICE DE ANEXOS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVOS.....	18
PLANTEAMIENTO.....	19
1. MARCO TEORICO	20
1.1 Aceites esenciales.....	20
1.2 Composición química de los aceites esenciales	22
1.3 Calidad de los aceites esenciales.	24
1.4 principales usos de los aceites esenciales.....	24
1.5 Economía de los aceites esenciales	26
1.6 métodos extracción.....	28
1.7 Cinética de extracción.	31
2. MARCO TEORICO ESPECÍFICO.....	33
2.1 Caléndula.....	33
2.1.2 Descripción botánica	34
2.1.3 Aspectos farmacológicos.....	36
2.1.4 Aspectos químicos.....	36
2.2 Información a nivel Colombia: cultivos, variedades, mercado (oferta y demanda). 38	
2.3 Investigaciones sobre la caléndula.	39
2.4 Aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.....	39
2.5 Composición química del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.....	40
2.6 Extracción aceite esencial de caléndula	41
2.7 Métodos para la extracción esencial de <i>calendula officinalis</i> l. en la experimentación	41

2.7.1 Hidrodestilación (HD)	41
2.7.2 Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación. (OAHD)	43
2.8 Modelamiento de la cinética de extracción	45
3. METODOLOGÍA.....	47
3.1 Materia prima vegetal.....	47
3.2 Aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i> L.....	49
4. METODOS	50
4.1 Métodos de caracterización de la materia prima	50
4.2 Extracción del aceite esencial	52
4.2.1 Curva de calibración mezcla aceite-hexano	52
4.2.2 Hidrodestilación.....	53
4.2.3 Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación.....	55
4.3 Parámetros cinéticos.....	57
4.4 Modelamiento matemático cinética de extracción:.....	58
4.5 Caracterización preliminar del aceite esencial de caléndula (<i>calendula officinalis</i> L.)	58
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
5.1 Caracterización de la materia prima.....	61
5.2 Diseño experimental para la extracción de aceites esenciales	61
5.2.1 Cinética de extracción del aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i> L.....	62
5.2.2 Hipótesis de investigación	63
5.2.3 Hipótesis estadísticas	63
5.2.4 Variables	64
5.2.4.3 Condiciones fijas	64
5.3 Caracterización preliminar del aceite esencial	65
5.4 Diseño factorial para la determinación del contenido de fenoles totales	65
5.4.1 Contenido de fenoles del aceite esencial (µg/mL)	66
5.4.2 Hipótesis de investigación.	66
5.4.3 Hipótesis estadísticas.....	66
5.4.3.1 Variables	68
6. RESULTADOS	69

6.1 Caracterización de la materia prima.....	69
6.2 Rendimiento de extracción del aceite esencial de caléndula (<i>calendula officinalis</i> L.)	70
6.3 cinética de extracción del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.	71
6.4 Modelamiento matemático cinética de extracción	74
6.5 Caracterización preliminar del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.	76
6.6 Requerimiento energético para la extracción de aceites esenciales mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido mediante hidrodestilación (OAHD).....	78
7. ANALISIS DE RESULTADOS.....	80
7.1 Caracterización de la materia prima.....	80
7.1.1 Humedad	80
7.1.2 Cenizas	81
7.1.3 Porcentaje de grasa.....	82
7.1.4 pH.....	82
7.1.5 Marcha fitoquímica	83
7.2.1 Incremento de la temperatura hasta punto de ebullición y Velocidad de incremento de la temperatura (°C/min)	83
7.2.2 Rendimiento (bs %v/w), tiempo acumulación aceite (min), tiempo total de extracción (min), duración de extracción (min) y velocidad de acumulación del aceite (mL/min).....	88
7.3 MODELAMIENTO CINETICA DE EXTRACCIÓN	93
7.4 Consumo energético	96
7.5 Caracterización preliminar del aceite esencial.	97
7.5.1 Descripción física del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.	97
7.5.2 Densidad	98
7.5.4 Índice de acidez	100
7.5.5 Contenido de fenoles totales (µg/mL) del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L	101
CONCLUSIONES	103
RECOMENDACIONES	105
BIBLIOGRAFIA	107
ANEXOS	120

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1 Usos de los aceites esenciales.....	25
- Tabla 2. Métodos de extracción de aceites esenciales.....	28
- Tabla 3. Clasificación científica <i>calendula officinalis</i> L.	33
- Tabla 4. Componentes del aceite esencial de caléndula cultivada en varias regiones del mundo.	37
- Tabla 5. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i> L.....	40
- Tabla 6. Especificaciones Aceite esencial de <i>Calendula officinalis</i> L.....	49
- Tabla 7. Combinación de tratamiento por grupo para la extracción del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.....	62
- Tabla 8. Matriz de combinación de tratamiento por grupo para el contenido de fenoles.	66
- Tabla 9. Caracterización flores <i>calendula officinalis</i> L.....	69
- Tabla 10. Caracterización fitoquímica extracto flores <i>calendula officinalis</i> L.....	69
- Tabla 11. Parámetros cinéticos de la extracción de aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.....	71
- Tabla 12. Modelamiento cinética de extracción aceite de <i>calendula officinalis</i> L..	76
- Tabla 13. Caracterización preliminar del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L..	76
- Tabla 14. Caracterización preliminar del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L..	77
- Tabla 15. Contenido total de fenoles (µg/mL) del aceite esencial de <i>calendula officinalis</i> L.....	78
- Tabla 16. Energía requerida para el incremento de la temperatura.....	78
- Tabla 17. Consumo energético de los métodos de extracción en Kw/h....	79

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura química de los compuestos de los aceites esenciales.....	22
- Figura 2. Importadores de aceites esenciales en el 2015 según el Centro de comercio internacional.....	26
- Figura 3. Cinética de extracción aceite esencial.....	32
- Figura 4. Algunas de las variedades cultivadas en Colombia de la caléndula (<i>Calendula officinalis</i> L.).....	35
- Figura 5. Estructura química de los flavonoides y carotenoides.....	38
- Figura 6. Equipo de hidrodestilación a nivel laboratorio.....	43
- Figura 7. Equipo de calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación	44
- Figura 8. Plántulas en germinación Invernadero SENA CEDAGRO.....	47
- Figura 9. Cultivo de flores de Caléndula officinalis L. en el municipio de Tibasosa (Boyacá).....	48
- Figura 10. Recolección del material vegetal. (1) corte de la flor, (2) empaque bolsas Ziploc, (3) almacenamiento congelación.....	48
- Figura 11. Determinación porcentaje de humedad y cenizas. (1) Porcentaje de humedad, (2) cenizas totales, (3) Cenizas en agua, (4) Cenizas en HCl.....	50
- Figura. 12 Equipo de extracción Soxhlet.....	51
- Figura 13 Medición del pH equipo Phywe.....	51
- Figura 14. Proceso de secado flores (1) secado en horno, (2) empaque flores de caléndula officinalis L, (3) almacenamiento flores secas.....	52
- Figura 15. Prueba de solubilidad del aceite en agua, Hexano y Diclorometano.....	53
- Figura 16. Montaje hidrodestilación a nivel laboratorio.....	54
- Figura 17. Partes equipo de calentamiento óhmico.....	55
- Figura 18. Pinza amperimétrica digital, Multímetro digital, Auto-transformador de Voltaje de 0 a 220 V.....	56
- Figura 19. Montaje calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación a nivel laboratorio.....	57
- Figura 20. Montaje determinación del índice de acidez.....	59

- Figura 21. Equipo de medición del índice de refracción NOVEX.....	59
- Figura 22. Espectrofotómetro.....	60
- Figura 23 Curva patrón índice de refracción.....	70
- Figura 24. Linealización de datos del incremento de la temperatura (°C/min) (A) Extracción de flores secas, (B) Extracción de flores secas.....	73
- Figura 25. Linealización de datos de la velocidad de acumulación del aceite rendimiento (% v/w) por unidad de tiempo(min)	74
- Figura 26. Incremento de la temperatura hasta ebullición por diferentes métodos de extracción.....	85
- Figura 27. Rendimiento de extracción por diferentes métodos de extracción. (HD)(OAHD) en función del tiempo de extracción.....	88
- Figura 28. Modelamiento de segundo orden, cinética de extracción mediante HD y OAHD.....	95
- Figura 29. Aceite esencial obtenido por diferentes métodos de extracción.....	98
- Figura 30. Histograma contenido de fenoles aceite esencial de Calendula por diferentes métodos de extracción.....	101

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1. protocolos de laboratorio para la caracterización materia prima.....	120
- ANEXO 2. curva de calibración índice de refracción aceite-hexano.....	127
- ANEXO 3 caracterización preliminar del aceite esencial de caléndula <i>officinalis</i> L.....	128
- ANEXO 4. Diseño de experimentos factorial de 2x2 con covariable (tiempo).....	132
- ANEXO 5. Diseño de experimentos factorial de 2x2, contenido de fenoles totales (FT).....	132
- ANEXO 6. Resultados de la caracterización de la materia prima <i>calendula Officinalis</i> L.....	132
- ANEXO 7. Resultado de las medidas de tendencia central de la caracterización de la materia prima <i>caléndula officinalis</i> L.....	133
- ANEXO 8. Resultados rendimiento de extracción del aceite esencial <i>caléndula Officinalis</i> L. mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación.....	133
- ANEXO 9. análisis de varianza (ANOVA) parámetros cinéticos de la extracción del aceite esencial de <i>caléndula officinalis</i> L.....	134
- ANEXO 10. Medidas de tendencia central parámetros cinéticos	149
- ANEXO 11. incremento de la temperatura de la extracción del aceite esencial <i>caléndula Officinalis</i> L. mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación.....	149
- ANEXO 12. Linealización de datos incremento de la temperatura (°C/min)	150
- ANEXO 13. Linealización de datos velocidad de acumulación del aceite rendimiento (% v/w) por unidad de tiempo (min)	151
- ANEXO 14. Análisis de varianza (ANOVA) modelamiento matemático cinética de extracción.....	152
- ANEXO 15. Resultados del modelamiento cinética de extracción.....	165
- ANEXO 16. Resultados Caracterización preliminar del aceite esencial de <i>caléndula officinalis</i> L.....	165
- ANEXO 17. Resultado de las medidas de tendencia central de la caracterización de la materia prima <i>caléndula Officinalis</i> L.....	166
- ANEXO 18. Resultados de la curva patrón contenido de fenoles totales.....	167
- ANEXO 19. Análisis de varianza (ANOVA) fenoles totales (µg/mL).....	168

RESUMEN

El objetivo en esta investigación, se centró en evaluar la cinética de extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L. obtenido mediante el método convencional por hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (AOHD) como técnica emergente e innovadora. Se emplearon flores en estado fresco y seco de *calendula officinalis* L. para cada uno de los métodos de extracción (HD y OAHD). Se caracterizó la materia prima en estado fresco, en relación al contenido de humedad, pH, acidez, cenizas, extracto etéreo y materia seca; los resultados obtenidos en relación al contenido de humedad y materia seca aportaron información de interés para los cálculos del rendimiento del aceite. Se evaluó el efecto de los métodos de extracción (HD y OAHD) y de los tratamientos (estado de la flor fresca y seca) sobre la cinética de extracción del aceite esencial de *calendula officinalis* L. indicando la existencia de diferencias significativas a un valor de $p \leq 0,05$. De acuerdo al test de Tukey, es el método de extracción por OAHD en donde se obtuvieron los mejores resultados tanto para la flor en estado fresco como en estado seco, y, entre estos, los obtenidos a partir de la flor en estado seco, determinando una velocidad de incremento de la temperatura de 38 °C/min, rendimiento 1,2847 %v/w a un tiempo total de 45 minutos. La cinética en cada uno de los métodos y tratamientos sigue un modelo matemático de segundo orden, por medio del cual se pudo establecer el comportamiento que sigue la extracción del aceite esencial en función del tiempo, y, permitió establecer la concentración máxima de aceite (C_s), la velocidad inicial de extracción (h), concentración de aceite esencial en cualquier momento (C_t) y la constante de extracción de segundo orden (k). Se evaluó el efecto de los métodos y tratamientos sobre el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/mL}$); los resultados obtenidos, no relacionaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) para el mismo estado de la flor de *calendula Officinalis* L. al emplear los métodos HD y OAHD pero si se registraron diferencias significativas al comparar la interacción entre estado de la flor y el método de extracción; se concluye que el proceso de secado de las flores tiene un marcado efecto sobre el desarrollo de estructuras fenólicas sobre las muestras de aceite esencial. Se evaluó el consumo de energía entre los métodos HD y OAHD y los tratamientos de la flor, en donde se dedujo que existió una reducción del 93.6% y 96.6 % cuando se comparó los consumos energéticos durante la extracción de flores frescas y secas de *Calendula officinalis* L. por los

métodos de HD y OAHD respectivamente, por lo tanto, en esta investigación, la extracción del aceite esencial de flores de *Calendula officinalis* L. por el método de OAHD puede ser considerado como una de las técnicas de mayor eficiencia para la extracción de aceites esenciales.

Palabras clave: extracción aceites esenciales, caléndula, aceite esencial de *Calendula officinalis* L., cinética de extracción, métodos de extracción de aceites, hidrodestilación, calentamiento óhmico, modelamiento cinética de aceites esenciales.

ABSTRACT

The objective in this research, it focused on evaluating the kinetics of extraction of essential oil of *Calendula officinalis* L. obtained by the conventional method by hydrodistillation (HD) and ohmic heating assisted of hidrodestilación (AOHD) as an emerging and innovative technology. Flowers were used in fresh and dry *Calendula officinalis* L. for each of the extraction methods (HD and OAHD). The raw material was characterized as fresh, in relation to moisture content, pH, acidity, ash, ether extract and dry matter; The results obtained in relation to moisture content and dry matter provided information of interest to oil yield calculation. the effect of extraction methods (HD and OAHD) and treatments (State of fresh and dry flower) on the kinetics of extraction of essential oil of calendula officinalis L. indicating the existence of significant differences worth was assessed $p \leq 0,05$. According Tukey's test is the method of extraction OAHD where the best results were obtained for both the flower in fresh and dry state, and among these, those obtained from the flower in the dry state, determined a rate of temperature increase of $38^{\circ}\text{C}/\text{min}$, yield 1.2847 %v /w a total time of 45 minutes. Kinetics in each of the methods and treatments follows a mathematical model of second order, by means of which could establish the behavior that the extraction of essential oil with time, and allowed to set the maximum oil concentration (C_s), the initial rate of extraction (h), concentration of essential oil at any time (C_t) and the extraction constant second order (k). the effect of the methods and treatments on total phenol content (mg/mL) was assessed; the results, not related significant differences ($p \geq 0.05$) for the same state of flower *Calendula officinalis* L. to use the HD and OAHD methods but significant differences were observed when comparing the interaction between state flower and the extraction method; It is concluded that the drying process of flowers has a marked effect on the development of phenolic structures of essential oil. Energy consumption between HD and OAHD methods and treatments flower evaluated, where it was concluded that there was a reduction of 93.6% and 96.6% when energy consumption was compared during extraction of fresh and dried flowers of *Calendula officinalis* L. by methods HD and OAHD respectively, therefore, in this research, the extraction of essential oil of *Calendula officinalis* L. flowers by the method of OAHD can be considered one of the most efficient techniques for extraction essential oils.

Keywords: extraction essential oils, caléndula, essential oil of *Calendula officinalis* L., kinetics of extraction, oil extraction methods, hydrodistillation, ohmic heating, kinetic modeling of essential oils.

INTRODUCCIÓN

Varias son las investigaciones que presentan a las plantas aromáticas como unidades económicas potenciales. La producción de hierbabuena, caléndula, romero, albahaca, tomillo, orégano entre otras, están en la mira del sector de alimentos funcionales. Sus aceites presentan una compleja composición química que los hace que sean excelentes antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, estimulantes digestivos por mencionar algunas. Los aceites esenciales de estas plantas son considerados como ingredientes bioactivos en la elaboración de alimentos funcionales, tal como lo expone (Viuda, 2014). Las investigaciones en el contexto nacional relacionan que las especies de hierbas aromáticas que en fresco tiene mayor demanda en la industria son: hierbabuena, caléndula, romero, albahaca, tomillo y orégano. La especie de caléndula es la segunda especie más utilizada para la elaboración de productos cosméticos y farmacéuticos, mientras las demás tienen mayor uso en la industria alimenticia. De acuerdo con Barrientos, *et al.*, (2012), en Colombia, la demanda de especies aromáticas es altamente reducida, y , para la producción de aceites aún más, pero es promisorio su industrialización dada la gran diversidad de materia prima. La brecha entre la demanda de especies aromáticas y la producción de sus aceites esenciales se relaciona con la no certificación de cultivos; el caso de la caléndula en el mercado nacional, los compradores devuelven entre el 70 y el 80% del material por contaminación o infestación, lo que reduce la calidad del material en términos de rendimiento y cantidad de sustancias bioactivas, esto también favorece que el 90% de las empresas de cosmetología importen el 100% de este extracto dado que en el país, este producto es de baja calidad y existe la irregularidad de los proveedores nacionales para cumplir con un determinado lote de producción con estándares de calidad.

Según estudios, la flor de caléndula presenta importantes propiedades funcionales derivadas de su composición, como el alto contenido de antioxidantes, la capacidad fotoestabilizante de los extractos hidroalcohólicos, actividad fungistática de los aceites esenciales y la actividad antibacterial del extracto hidroacetónico y del extracto etanólico. Hay un alto número de investigaciones que evalúan el extracto de flores de *Calendula officinalis* L. desde la óptica médica, farmacéutica y cosmética a nivel de su composición química, propiedades antioxidantes y antimicrobianas, pero se dispone de muy poca información científica y técnica

sobre estudios que relacionen la cinética de extracción del aceite y su aplicación en el sector de alimentos. En este sentido, en un esfuerzo por fortalecer la cadena productiva de plantas aromáticas, medicinales (PAMC) y condimentarias de la zona de Influencia (Provincia del Tundama) y formular productos de investigación que conlleven a generar en el cultivo de *Calendula officinalis* L un alto valor agregado, se generó la necesidad de formular esta propuesta de investigación, cociendo que las técnicas analíticas y de separación juegan un papel determinante para asegurar la completa extracción y estudios fotoquímicos de los extractos y aceites esenciales de *Calendula officinalis* L.

Esta propuesta de investigación contribuye al estudio de la cinética de extracción de aceites esenciales, específicamente a partir de las flores de *Calendula officinalis* L., cuyo objetivo principal fue evaluar la cinética de extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L. obtenido mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (OAHD). Se realizaron varias etapas en la investigación: la primera, una caracterización de la flores frescas de *Calendula officinalis* L.; la segunda, la cinética de extracción: determinación de los parámetros cinéticos (tasa de incremento de temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) , velocidad de acumulación del aceite (ml/min), tiempo total de extracción (min), rendimiento de extracción del aceite esencial (ml de aceite esencial/ 100 gramos de muestra), incluyendo el modelamiento del proceso que correspondió a una cinética de segundo orden. Y la tercera etapa, la caracterización preliminar del aceite en cuanto a la determinación de sus constantes físicas y el contenido de fenoles total ($\mu\text{g}/\text{mL}$). En la investigación se obtuvieron dos tipos de aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido mediante dos métodos de extracción HD y OAHD con dos (2) niveles como tratamientos (estado de la flor fresca y seca).

OBJETIVOS

GENERAL: Evaluar la Cinética de extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L., obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación.

1. ESPECÍFICOS:

- Caracterizar física y químicamente las flores de *Calendula officinalis* L., en estado fresco, en relación al contenido de humedad, pH, acidez, cenizas, extracto etéreo y materia seca.
2. Determinar los parámetros cinéticos como tasa de incremento de temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$), inicio de acumulación del aceite (min), velocidad de acumulación del aceite (ml/min), tiempo total de extracción (min), rendimiento (ml de aceite esencial/100 gramos de muestra), en la extracción del aceite esencial por hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación en flores de *Calendula officinalis* L.
3. Determinar y evaluar la cinética de extracción (% rendimiento/t(min)) del aceite esencial, evaluar diferencias significativas entre los métodos de extracción (hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación) en la obtención del aceite esencial obtenido a partir de flores de *Calendula officinalis* L.
4. Analizar los fenómenos de transporte en relación a la transferencia de masa y calor que se registran en el proceso de la extracción del aceite esencial obtenido por hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación en flores de *Calendula officinalis* L.
5. Validar mediante modelamiento matemático de segundo orden los parámetros cinéticos de rendimiento (%v-w), la velocidad de extracción de aceite (mL/min) y predecir la velocidad inicial de extracción en función del tiempo de acumulación de aceite.
6. Caracterización preliminar del aceite esencial de *Calendula officinalis* L., obtenido por hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación, en relación a la densidad, índice de refracción e índice de acidez incluyendo algunos ensayos fitoquímicos cualitativos.
7. Determinar y evaluar diferencias significativas, en el contenido de fenoles totales en el aceite esencial de *Calendula officinalis* L., obtenido por hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación.

PLANTEAMIENTO

En esta propuesta de investigación se dan los siguientes planteamientos:

- ¿Los parámetros cinéticos como comparación entre los perfiles de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) por unidad de tiempo (min), determinación de la velocidad de acumulación de aceite (ml/min), rendimiento de extracción del aceite esencial (ml de aceite esencial/100 gramos de muestra) con respecto al tiempo, permiten evaluar el efecto de la hidrodestilación y el calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación en la extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L.?
- ¿El porcentaje de humedad de las muestras puede llegar a modificar los parámetros cinéticos y el rendimiento de extracción (ml/min) del aceite esencial obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación en flores de *Calendula officinalis* L.?
- ¿El modelamiento de la cinética de extracción permite analizar el comportamiento linealizado del rendimiento (ml de aceite esencial/100 gramos de muestra) y de la determinación de la velocidad de acumulación de aceite (ml/min) a partir de los datos experimentales?
- ¿El contenido de Fenoles ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de *Calendula officinalis* L. se puede ver afectado por los procesos de extracción (hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación) y estado de la flor (fresco y seco)?

1. MARCO TEORICO

1.1 Aceites esenciales

Según (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012) Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, es decir que se evaporan rápidamente al exponerlos al aire y a ciertas temperaturas, (Perez, 2014) generalmente son mezclas homogéneas de hasta 100 compuestos químicos orgánicos, provenientes de la familia química de los terpenoides. Dentro de los compuestos químicos están los terpenos con fórmula $(C_5H_8)_n$ (Flores, 2010) junto con otros como alcoholes, éteres, y compuestos fenólicos que son los encargados del aroma característico de cada aceite esencial (Gil & Saez, 2000)

Las plantas que poseen dentro de sus componentes aceites esenciales son las que pertenecen a las siguientes familias las: Labiadas, Umbelíferas, Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas y Asteráceas.” (Plazas, 2011)

Los aceites esenciales se producen en la planta en el momento que se activan los mecanismos de defensa para la protección de la planta debido a factores ambientales y ecológicos (ataques de insectos), estos presentan roles de defensa, atracción de polinizadores, entre otros.

Los aceites esenciales se encuentran en diferentes partes de las plantas: en las hojas, raíces, pericarpio del fruto, semillas, tallo, cortezas, flores o en los frutos, dichos aceites esenciales Se clasifican en tres grupos.

- **Consistencia:** esencias que son líquidos volátiles a temperatura ambiente, los que presentan una consistencia más espesa, son poco volátiles y las oleorresinas tienen una consistencia viscosa o son semisólidas, dentro de esta clasificación hay otra subdivisión que ayuda a la clasificación del aceite esencial de acuerdo a la viscosidad del mismo y se dividen en oleorresinas (de consistencia bastante viscosa), bálsamos (poco volátiles y de consistencia espesa) y fluidos (muy volátiles y de consistencia líquida).

- **Origen:** de origen natural, se obtienen directamente de la planta, tienen un bajo rendimiento lo que los hace costosos, los de origen artificial los cuales también se obtienen directamente de la planta pero se hacen mezclas con otras esencias u otros componentes y los sintéticos o artificiales los cuales se obtienen por medio de procesos químicos y no son tan costosos como los de origen natural.
- **Composición química:** Esta clasificación se hace de acuerdo al componente mayoritario que se encuentre en el aceite esencial, que puede ser aceites esenciales monoterpenicos (hierbabuena), sesquiterpenicos (pino) o fenipropanoides (canela).

Hay factores de los cuales dependen la composición de los aceites obtenidos así como de la calidad y el rendimiento del mismo, muchos de los factores son de la parte del cultivo de las plantas como clima, variedad de la planta, condiciones de crecimiento, tipo de suelo, uso de fertilizantes, maduración de la planta y otras de postcosecha como la recolección de la planta, forma de almacenamiento, y método de extracción del aceite dentro de este último parámetro está el tamaño del material que se utilice, si se usa en fresco o seco y la temperatura que se utiliza en el método de extracción la cual puede afectar la composición química del aceite esencial. (Rodríguez, *et al.*, 2012), de estos factores se condiciona la aplicabilidad del aceite esencial obtenido debido a la calidad que debe ser óptima para así lograr tener un buen precio en el mercado y aceptabilidad del producto.

Los aceites esenciales poseen ciertas características físicas como lo son:

- **Color:** Generalmente son incoloros pero también se pueden encontrar de color amarillo (todas las gamas de amarillo desde el más intenso hasta el más tenue)
- **Olor:** Es característico dependiendo del tipo de material vegetal con el cual se esté trabajando el cual puede ser floral o frutal, el problema que hay con el olor de los mismos es que son muy volátiles al estar en contacto con el medio ambiente.
- **Su densidad** es menor que la del agua, se encuentran en estado líquido a una temperatura ambiente, son insolubles en agua y su índice de refracción es alto.

1.2 Composición química de los aceites esenciales

La composición de los aceites esenciales es una serie de sustancias químicas bastante complejas, las cuales varían dependiendo de la planta de la cual se extrae el aceite esencial, (Perez, 2014) y también de las condiciones del cultivo (clima, estaciones, factores genéticos) , los componentes principales de los aceites esenciales se muestran en la figura 1, donde se encuentran en gran proporción los terpenos, compuestos oxigenados, aldehídos, cetonas y ácidos libres y en menor proporción los éteres y ésteres. (Flores, 2010) (Miguel, 2015) (Miguel Gordo, 2015).

Existen formas de distinguir los individuos de una misma especie (para clasificarlas de forma botánica) pero que tienen diferentes características en cuanto a su composición química a lo cual se le conoce con el nombre de “quimiotipo” uno de los ejemplos es el caso del tomillo, *Thymus vulgaris*, que tiene 6 quimiotipos distintos, por lo que se debe nombrar la planta según el componente más característico que posea por ejemplo, *Thymus vulgaris* genaril ó *Thymus vulgaris* timol, (Flores, 2010) es importante esta definición ya que de acuerdo a ella se puede conocer la actividad del aceite esencial.

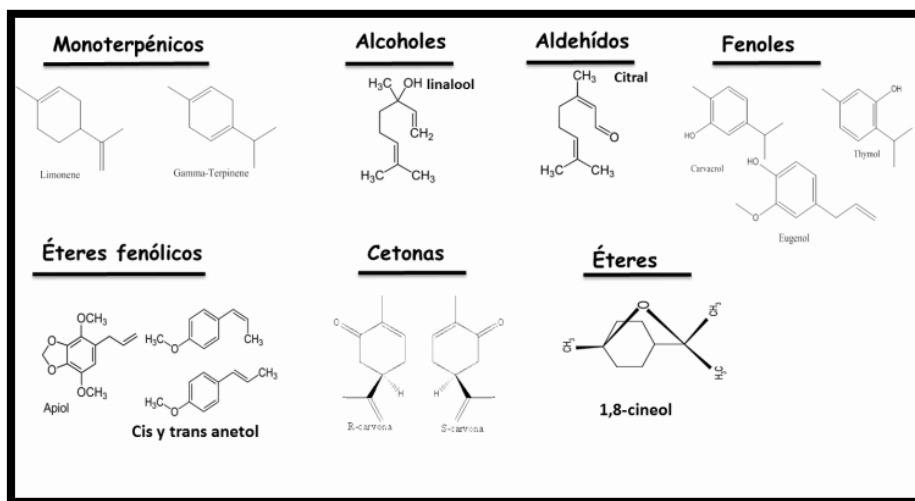


Figura 1. Estructura química de los compuestos de los aceites esenciales

Dentro de los componentes químicos que se encuentran en los aceites esenciales se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

- **No terpenoides.** Las sustancias de este grupo no son de importancia ya que son sustancias de tipo aromático, nitrogenadas o con azufre, las cuales son sustancias alifáticas de cadena corta, y no tienen grandes aplicaciones en la industria como en el caso de las terpenoides.
- **Terpenoides.** Estos tipos de sustancias a diferencia de las no terpenoides poseen propiedades importantes pueden ser de tipo cíclico, aromático o alifático, entre estos están: isopreno, monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. Los terpenoides en las plantas cumplen diversas funciones sobretodo en procesos bioquímicos como pigmentos, insecticidas, feromonas entre otros. Son de gran interés y estudio en diferentes áreas y tienen una gran aplicación en productos como perfumería, jabones entre otros.

En las plantas aromáticas los que más se encuentran son los monoterpénicos los cuales se clasifican de acuerdo en su estructura en monocíclicos (1-4 cineol), cíclicos (linalol) y bicíclicos (carano), se encuentran en la planta en las hojas, tallos y flores.

Según los grupos funcionales también se pueden clasificar en:

- Alcoholes (mentol) y fenoles (timol) los alcoholes tienen una gran importancia no solo por sus propiedades sino también por su aroma, presentan propiedades Antisépticas y Antimicrobianas, mientras que los fenoles tienen propiedades analgésicas y bactericidas se encuentran en pocas especies de plantas pero estos compuestos son bastante irritantes.
- Aldehídos (Citral, benzaldehído) y cetonas (alcanfor) Los aldehídos se encuentran en mayor concentración en los cítricos y son los que le dan el aroma característico, poseen propiedades antivirales y sedantes, pero también pueden dar alergias en la piel por lo que no se utilizan para uso tópico, las cetonas son moléculas estables que se producen por la oxidación de los alcoholes.
- Ésteres (metil salicilato, acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo). Se forman en presencia de un alcohol terpenico o ácido acético. Poseen propiedades Espasmolíticas, antifúngicas y antiinflamatorias.

- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol) Estos compuestos son bastante inestables, los éteres fenólicos se encuentran en ciertos tipos de plantas como el Anís, albahaca, anís, perejil, los éteres Poseen propiedades expectorantes, las cuales se usan a nivel medicinal o aromaterapia como en el caso del 1-8 cineol o eucaliptol, en el caso de los peróxidos
- Hidrocarburos monoterpénicos (limoneno, α y β pineno) Son los que se encuentran en mayor abundancia en los aceites esenciales y son precursores de otros más complejos, como los terpenos oxidados. Posee propiedades antivíricas, estimulantes y descongestionantes.

1.3 Calidad de los aceites esenciales.

Para determinar la calidad de los aceites esenciales es necesario medir ciertos parámetros que pueden ser de tipo organoléptico (olor, color, sabor), fisicoquímico (humedad, cenizas, análisis cromatográfico, densidad, índice de refracción, acidez, índice de saponificación, peso específico entre otros), microbiológico (contra bacterias, mohos, levaduras).

1.4 principales usos de los aceites esenciales

La mayoría de los aceites esenciales obtenidos de las plantas aromáticas tienen usos medicinales, en la industria alimentaria, industria química, laboratorios farmacéuticos, centros naturalistas, y en perfumería, como se muestra en la tabla 1 esto debido a sus propiedades tanto químicas como organolépticas y medicinales en algunos casos, actualmente se ha ampliado su uso en aromaterapia y fabricación de productos naturales.

Se tienen indicios de que los aceites esenciales han sido utilizados desde la antigüedad con propósitos medicinales y curativos. (Plazas, 2011).

Tabla 1

Usos de los aceites esenciales

	<i>Uso</i>
<i>Industria Alimentaria</i>	<p>En industria alimentaria se usan algunas veces por sus aromas y sabores en alimentos de panadería, heladería, postres, galletería, confitería, jugos y bebidas alcohólicas entre otros (Dominguez, 2012), también se utilizan para dar sabor o condimentar algunas clases de alimentos como por ejemplo carnes, o sopas en donde se utiliza el aceite de cilantro.</p> <p>También se han hecho investigaciones para el uso de los aceites esenciales para la conservación de alimentos como (Rodriguez, & Julio, 2011) que usaron el aceite esencial de Candia (<i>Hibiscus esculentus</i>) para conservar hamburguesas, Méndez, G, (García, Santellano, Durán, & Silva, 2015) evaluaron el efecto en la calidad del aceite esencial de orégano en la calidad de la pechuga de pollos de engorda y (Sánchez, <i>et al.</i>, 2015) que elaboraron y caracterizaron películas comestibles a partir del aceite esencial de limón, entre otras investigaciones, con lo que se puede comprobar el amplio uso de los aceites esenciales en la industria alimentaria obteniendo buenos resultados.</p>
<i>Industria química</i>	<p>Para la elaboración de detergentes, shampoo, ceras. (González, 2004)</p> <p>Se usa para disminuir o eliminar olores desagradables que se derivan de productos industriales como el caucho, los plásticos, textiles, juguetes, pinturas y en papelería para poner de fragancias en productos como cuadernos, papel higiénico, toallas desmaquillantes. (Flores, 2010).</p>
<i>Industria Farmacéutica</i>	<p>Por sus propiedades estos aceites esenciales son utilizados como analgésicos, neutralizantes de sabor (debido al mal sabor de algunos medicamentos), e inhalantes, como es el caso del aceite esencial de eucalipto que se usa para descongestionar las vías respiratorias. (Flores, 2010). (Rodriguez, & Julio, 2011)</p>

	Medicina alternativa y natural (aunque pueden presentar problemas debido a la dosis que puede llegar a ser tóxica dependiendo de la persona y la forma de uso) se usan los aceites esenciales como astringentes, antisépticos, antiparasitarios, para problemas con el sistema digestivo, nervioso, respiratorio, tratar problemas de enfermedades como la artritis, entre otros usos. (Flores, M. 2010). Como tratamiento de enfermedades de origen infeccioso por las actividades antibacterianas, antisépticas y anti-fúngicas. (Flores, 2010).
Industria de Cosméticos	Se usan para producir cremas, cosméticos, jabones, (Gil, & Saez, 2000). champús, maquillaje, perfumes, talcos y en productos para la piel que ayuden a combatir el acné debido a sus propiedades antisépticas, para esta clase de uso (cosmético) los que más se utilizan son el de caléndula, lavanda y rosas entre otros. (Rodríguez, & Julio, 2011)
Industria de productos de uso veterinario, insecticidas	Esta industria emplea el aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosoides</i> muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo, en el uso veterinario se buscan aceites esenciales que tengan dentro de sus componentes mentol y limonero para matar pulgas (Rodríguez, & Julio, 2011) Contra hormigas, moscas, polillas, áfidos, pulgas, piojos, cucarachas, entre otros. (Flores, 2010).

1.5 Economía de los aceites esenciales

A nivel mundial existe una gran demanda de aceites esenciales los cuales no solo se utilizan puros sino que también como materias primas que se adicionan a productos para tener un mayor valor agregado para el consumidor, se clasifican según su uso para fragancias, medicamentos, químicos, para aromas y sabores, dichos aceites esenciales dieron ganancias a nivel mundial en el año 2015 según el Centro de comercio internacional fue de 109.996.556 millones de dólares y los más grandes importadores se muestran en la figura 2.

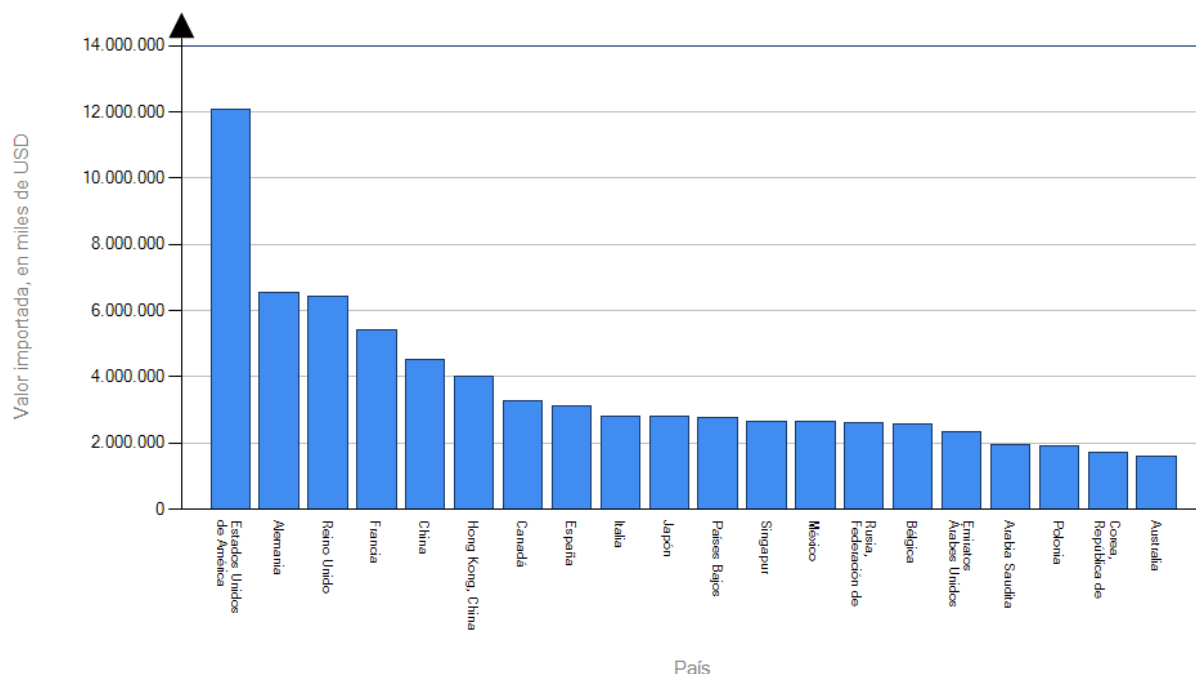


Figura 2. Importadores de aceites esenciales en el 2015 según el Centro de comercio internacional. Tomado de: Lista de los países importadores para el producto seleccionado en 2015. Producto: 33 Aceites esenciales y resinoides; preparaciones de perfumería, de tocador o de cosmética, de: [http://www.trademap.org/tradestat/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3|||||33||2|1|1|1|1|1|1|1](http://www.trademap.org/tradestat/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3|||||33||2|1|1|1|1|1|1|1|1)

Siendo el mayor importador Estados Unidos con 109.996.556 millones de dólares y el menor Irlanda con 1.175.147 millones de dólares.

Colombia posee una gran diversidad de climas en los cuales se podrían sembrar un sin número de plantas aromáticas y así fomentar el mercado de los aceites esenciales pero lamentablemente nuestro país no se han realizado investigaciones que ayuden al desarrollo económico de este producto y aprovechamiento de la diversidad de plantas que se pueden cultivar en el territorio, ya que se debe tener cierta calidad en el aceite esencial el cual se da por las condiciones del cultivo (siembra, abono, riego, abonos, clima, altitud), actividades de postcosecha, método de extracción, y procesos industriales, el valor de los aceites esenciales depende de su pureza entre más puro más costoso es debido al bajo rendimiento que se obtiene de ciertas plantas.

Según una noticia de la universidad nacional de Colombia en el año 2008, se afirma que las esencias tienen una demanda global de 100.000 toneladas anuales y con ganancias de hasta 900 millones de dólares; y según la encuesta nacional de plantas medicinales y aromáticas del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos *Alexander von Humboldt*, las especies

aromáticas más comercializadas en el país son: Ajenjo, Limoncillo, Ajo, Manzanilla, Alcachofa, Marrubio, Berenjena, Ortiga, Boldo, Prontoalivio, Caléndula, Sábila, Chuchuguaza, Toronjil, Cidrón, Totumo, Cola de caballo, Uña de gato, Diente de León, Valeriana, Eucalipto, Yerbabuena, Gingko biloba, Zarzaparrilla y Ginseng.

1.6 métodos extracción

Para la extracción de aceites esenciales de una planta hay que seguir varias etapas: selección y adquisición del material vegetal, adecuación de la muestra y finalmente realizar el proceso de extracción más adecuado, los métodos de extracción más utilizados se describen en la tabla 2.

Tabla 2.

Métodos de extracción de aceites esenciales

Destilación por arrastre de vapor	Su función es separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, este proceso se basa en el equilibrio de los líquidos inmiscibles, el componente volátil queda condensado en el matraz, al final de la extracción se obtiene un extracto acuoso donde se debe ver el extracto deseado separado del acuoso, no se puede aplicar en las flores, este proceso es bajo en costo y se obtienen buenos rendimientos tiene un problema y es el tiempo de extracción el cual es bastante largo.
Hidrodestilación	Es un derivado de la destilación por arrastre de vapor, tiene el mismo principio pero al final del refrigerante tiene una trampa mediante la cual se separa el aceite del agua condensada, tiene problemas con el tiempo de extracción del aceite el cual es largo, Las ventajas de este equipo son: su simplicidad y flexibilidad para trabajar con aceites de diferente densidad y naturaleza. Existe un equipo que sirve para optimizar el proceso de hidrodestilación el cual es el equipo de Clevenger. Equipo Clevenger (Günther, 1948) el cual es el más adecuado para la determinación del contenido total del aceite esencial de

	<p>una planta aromática, se usan a nivel de laboratorio, tiene ventajas en cuanto a su simplicidad y flexibilidad y las desventajas son que el tiempo de extracción es muy largo lo cual representa pérdidas a nivel industrial donde lo que se busca es optimizar procesos</p> <p>Los extractos obtenidos mediante este método son más coloreados y se hace necesaria una refinación al final del proceso.</p>
Extracción con CO₂ supercrítico	<p>costoso en la parte inicial, pero es uno de los mejores métodos de extracción, se obtienen buenos resultados en cuanto al rendimiento y es amigable con el medio ambiente</p> <p>Presenta ventajas en que el extracto obtenido es libre de disolventes y el tiempo de extracción es más rápida comparada con el método de extracción con solventes orgánicos, la temperatura que se utiliza para la extracción no es tan elevada con lo cual se conservan algunos de los compuestos importantes del aceite esencial, se obtienen mejores rendimientos, no necesita de tanta energía para la extracción.</p> <p>Las desventajas que presenta es que junto con el aceite esencial se extraen compuestos de alto peso molecular.</p>
Extracción con solventes volátiles	<p>En este método se toma la muestra vegetal en estado seco y se le agregan disolventes orgánicos (alcohol y cloroformo) estas no solo extraen la esencia sino también grasas y ceras, obteniéndose al final de la extracción un extracto impuro conocido con el nombre de oleorresina.</p> <p>El aceite esencial obtenido no es puro, ya que con los solventes se solubilizan componentes como ceras y grasas, se utiliza solo a nivel laboratorio ya que presenta desventajas ya que es costoso y contamina el medio ambiente y son riesgosos ya que por sus componentes pueden generar incendios o explosiones.</p>
Maceración con solventes no volátiles y enfleurage	<p>Costoso y se obtiene un poco rendimiento, el enfleurage se usa para extraer aceites de flores delicadas en este método se “impregnan las sustancias aromáticas en grasa y después extraer</p>

		<p>el aceite oloroso con alcohol de alta pureza.” La muestra que casi siempre es para pétalos de flores, donde para separar el aceite se utiliza grasa RBD la cual se pone en contacto con los pétalos de las flores en fresco, se dejan por un tiempo (puede ser de horas o de días dependiendo del tipo de material vegetal del cual se desee extraer el aceite.) La grasa se reutiliza con diferentes cargas de muestras vegetales, y cuando este ya se encuentra saturado se trata con algún solvente alcohólico, para poder separar el aceite en cuestión.</p>
Extracción por Microondas sin solventes (SFME)		<p>Es muy utilizado en la industria alimentaria, es una combinación de calentamiento por microondas y la destilación seca realizada a presión atmosférica sin ningún disolvente o adición de agua</p> <p>Se hace en condiciones controladas de temperatura y presión para calentar la muestra. Es un método donde la radiación va directamente a la muestra y no al contenedor de la muestra. Mediante esta técnica se alcanza en minutos el punto de ebullición del solvente y la penetración al tejido biológico. Presenta ventajas en que si se trabaja bajo parámetros óptimos de operación, se evita la degradación de bioactivos, y también con el tiempo de extracción el cual es rápido.</p>
Calentamiento óhmico		<p>(También conocido como calentamiento Joule, la electro calefacción y electro calentamiento por conducción) se define como un proceso en el que en una corriente eléctrica (por lo general alterna) se pasa a través de materiales para generar calor dentro del producto. El calentamiento se produce en la forma de transformación de la energía dentro del material. El proceso óhmico es un método rápido que lleva entre pocos segundos o minutos para generar el calor y en la extracción de aceites esenciales.</p> <p>ser considera como un método nuevo para extraer aceites esenciales además como una tecnología verde ya que requiere de</p>

menos energía por ml obtenido de extracto de aceite esencial ,
haciendo este método amigable con el medio ambiente porque no
requiere de ningún solvente orgánico.

1.7 Cinética de extracción.

En la extracción de aceites esenciales varios son los parámetros a medir para definir la eficiencia de un proceso en términos de costos (cantidad de aceite obtenido por cantidad de materia prima; cantidad de Kw hora por cantidad de aceite obtenido), en términos de emisiones contaminantes (gramos de CO₂ por cantidad de aceite obtenido; tipo y cantidad de solventes de acuerdo al tipo de extracción), en términos de calidad química de aceite (composición química y actividad biológica).

Al relacionar la cantidad de aceite obtenido por cantidad de materia prima se hace referencia al “rendimiento de extracción”, el cual se define como los mililitros (mL) de aceite obtenido de una cantidad en gramos (gr) de material vegetal, como lo hace (Bampouli, 2014) algunas veces la ecuación se calcula en masa o en volumen como se muestra en las siguientes ecuaciones del % de rendimiento

$$\%Rendimiento = \frac{gr\ de\ aceite\ esencial\ extraído}{gr\ de\ material\ vegetal} \times 100$$

En las curvas de la cinética como se muestra en la figura 3 hay un tiempo inicial donde se obtiene extracto acuoso, después se empieza a observar la extracción del aceite esencial el cual ocurre de manera rápida, y por último el proceso se termina cuando se deja de obtener y acumular el aceite esencial.

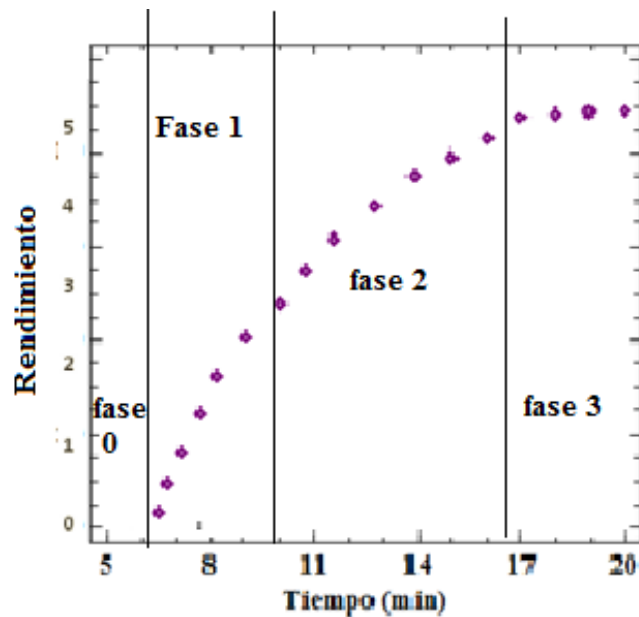


Figura 3. Cinética de extracción aceite esencial

Las fases se describen según (Boukroufa, 2015).

- Fase 0: , indica el tiempo que se demora en llegar a la temperatura de ebullición
- Fase 1: es una fase preliminar hay un incremento en el rendimiento y en la extracción se obtiene el 76% del rendimiento.
- Fase 2: Está representada por una curva lineal que aumenta. Representa la acumulación del aceite en la cual se puede obtener hasta el 24% de la extracción. Durante esta etapa el aceite se volatiliza rápidamente y se mezcla con el vapor de agua y así puede ser separado de las matrices vegetales.
- Fase 3: está representada por una línea horizontal que marca el final del proceso de extracción, donde no se obtiene más aceite.

2. MARCO TEORICO ESPECÍFICO

2.1 Caléndula

La Caléndula pertenece a la familia Asteraceae, es una planta anual, puede tener entre 10-100 cm de altura dependiendo de la especie, su clasificación científica o taxonómica se puede ver en la tabla 3, esta planta se encuentra extendida en el centro y sur de Europa, norte de África, el suroeste de Asia. Las hojas son en forma de lanza, produce flores durante todo el año, pero los picos de floración están entre marzo y julio, esta planta ha sido tradicionalmente utilizada por sus efectos anti inflamatorios, anti-oxidantes, anti-fúngicos, anti-edemas, anti-diabéticas y propiedades curativas. (Paolini, *et al.*, 2010).

Tabla 3.

Clasificación científica calendula officinalis L. (Miguel Gordo, 2015) y (Palma, 2014)

Clasificación Científica	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Subfamilia	<i>Asteroideae</i>
Tribu	<i>Calenduleae</i>
Género:	<i>Calendula</i>
Especie:	<i>Calendula officinalis L.</i>

Contiene propiedades antioxidantes (carotenos, flavonoides y compuestos fenólicos) también contiene compuestos como esteroides, triterpenoides, ácidos fenólicos carotenos (β -caroteno, α -caroteno), rutinosido, flavoxantina, entre otros. (Loescher, *et al.*, 2014) y (Muñoz, 2004)

La caléndula se conoce con los nombres de “botón de oro” o en inglés “marygold” , “flor de muerto”, “maravilla de crisol” y como maravilla (por sus propiedades medicinales), se caracteriza por tener una flor brillante con colores que varían entre naranja y amarillo, es

proveniente de la zona mediterránea (Egipto) y se siembra en Europa desde el siglo XII después se extendió por todo el mundo, su nombre proviene de la palabra <calendae> ya que florece los primeros días de cada mes y se le dio en la antigua Roma (Acosta de la Luz, Rodríguez, & Sánchez. 2001), esta planta se ha extendido por todo el mundo debido a sus compuestos químicos que la hacen una flor con muchas propiedades además que para su cultivo no necesita requerimientos especiales, dentro de sus características organolépticas no es agradable al gusto ya que es amarga y el olor tampoco es agradable.

2.1.2 Descripción botánica

La *Calendula Officinalis* L., es una planta de hojas simples, su tallo puede crecer hasta los 60 cm de altura, sus flores son externas, liguladas y pueden tener un diámetro de hasta 2 cm, (Muñoz, 2004) los colores más comunes son el amarillo y el anaranjado los cuales son muy vistosos y brillantes, estas flores se cierran de noche y en el día (más que todo al medio día) abren de nuevo y en este momento es que se debe hacer la cosecha de las mismas.

Esta planta puede crecer en alturas que van desde la del nivel del mar hasta los 1000 m.s.n.m, la temperatura óptima de germinación va desde los 18°C hasta los 24°C, la fecha de su siembra es preferiblemente en el mes de noviembre, necesitan de un riego diario hasta que germinan totalmente, después el riego puede ser de día de por medio (Palma, 2014) existen muchas variedades las cuales se diferencian entre sí por el color de la flor (amarillo, naranja, o combinado), el tamaño y la corola.

En Colombia el cultivo de *Calendula officinalis* L., es importante en el Valle del Cauca donde se vende en mayor proporción y es usada para productos medicinales o cosméticos como cremas corporales, jabones, geles, los cuales ayudan a problemas en la piel, cicatrizantes, y problemas gastrointestinales, sus variedades se muestran en la figura 4, “Según la Encuesta nacional de plantas medicinales y aromáticas de Colombia, realizada por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, la *Calendula officinalis* L., es empleada por el 72% de los laboratorios del país y es la especie (dentro de este grupo) con mayor volumen de comercialización, con un porcentaje total de 26,9%.” (Campo, 2012)



Figura 4. Algunas de las variedades cultivadas en Colombia de la caléndula (*Calendula officinalis* L.) Fuente de la imagen: autor.

La recolección de las flores de *calendula officinalis* L. se debe hacer de forma manual y en las horas del mediodía a una temperatura máxima de 35°C, las flores de color naranja más intenso poseen más sustancias activas que las que son de colores más pálidos, es recomendable hacer un proceso de secado que puede ser al aire libre o en un horno (a temperaturas adecuadas que no vayan a afectar su composición química) para mantener y conservar las propiedades y principios activos de la planta.

A la flor de la *calendula officinalis* L. se le debe hacer un proceso secado debido a que de esta forma se preserva por un mayor tiempo los principios activos de la planta (carotenoides y flavonoides) y este se debe hacer lo más pronto posible después de su recolección para garantizar que el proceso se haga de forma adecuada, se debe tener cuidado con la temperatura en la cual se hace el secado, a 80 °C se obtienen mayores rendimientos de carotenoides y flavonoides, a 20 °C no se dan buenos resultados ya que las enzimas no pueden actuar de forma adecuada con ello obteniéndose un menor rendimiento en estos compuestos y si se hace a una temperatura mayor o igual a 100 °C se reducen en gran proporción los principios activos de la planta. (Lastra, & Piquet, 1999) La mejor forma de secado es al sol (en lugares donde se permita debido a la temperatura) a 40°C donde se obtienen los mejores rendimientos en los extractos de la planta.

2.1.3 Aspectos farmacológicos

La caléndula tiene muchísimas propiedades y usos entre los que se destacan: en bebidas como infusión, uso en cosmetología (Palma, 2014), cremas, ungüentos, maquillaje, jabones, loción (Lastra, & Piquet, 1999), para el tratamiento de muchas afecciones sobretodo en la piel como curación de las heridas, infecciones, inflamaciones, quemaduras, cicatrización de heridas leves, debido a sus propiedades como cicatrizante, antiinflamatorio, antibacteriano y anti fúngico. En enfermedades gastrointestinales como estomatitis, gastritis, úlceras; su aceite esencial es usado en el tratamiento de heridas cutáneas, es usado como fungicida, y cicatrización de heridas. (Lastra, & Piquet, 1999), (Fonnegra, & Jimenez, 2007)

Según artículo científico publicado por Preethi, Kuttan, & kuttan, titulado *Antioxidant potential of an extrac of caléndula officinalis flowers in vitro and in vivo*. El extracto de la flor de *Caléndula officinalis* presenta una actividad antioxidante significativa y posee diversos componentes como flavonoides, triterpenoides, carotenoides y cumarinas los cuales contribuyen a su acción antioxidante, y que posea actividades antiinflamatorias, farmacológicas, acción preventiva contra dermatitis y efecto genotóxico; ellos afirman en su investigación que el extracto de las flores de *calendula officinalis* por su gran potencial antioxidante puede ser estudiada para su uso en diferentes desordenes como problemas cardiovasculares y cáncer.

Según Miguel (2015) “En ensayos clínicos en humanos, una pomada a base de caléndula resultó altamente efectiva para la prevención de la dermatitis aguda durante la radiación contra el cáncer de pecho (Pommier *et al.*, 2004), un aceite con extracto de caléndula parece acelerar la curación con efectos positivos sobre la epitelización de las úlceras venosas de las piernas (Duran *et al.*, 2005)”

2.1.4 Aspectos químicos

La composición química de las flores *Calendula officinalis* L., dependen del tipo de flor y cuidados en el cultivo pero en general esta planta presenta muchos tipos de compuestos químicos, los de más importancia y que se encuentran en mayor proporción son los flavonoides y carotenoides (precursores de la vitamina A y retinoides y actúan como antioxidantes) que son pigmentos, también posee esteroides, terpenoides, triterpenoides, ácidos fenólicos, alcoholes,

saponósidos, cumarinas y aceite esencial del cual se obtienen muy bajos rendimientos aproximadamente un 0,3%. Otros componentes que posee la planta en su aceite esencial son: Alcoholes sesquiterpenicos (cardinol), monoterpenoides, otros componentes pueden ser observados en la tabla 4.

Tabla 4.

Componentes del aceite esencial de caléndula cultivada en varias regiones del mundo.
(Abdullabekova. *et al.*, 2014)

The components of calendula's essential oils	Russia	Iran	South Africa	Brazil	Uzbekistan
α -amorphen	+	–	–	–	+
γ -kadinen	+	–	+	+	+
Viridiflorol	+	–	–	+	+
1H-ciclopropazulen 4-ol, dekagidro-1	–	–	–	–	+
T-muurolol-1-naftalenol	–	–	+	–	+
Leden1H- ciclopropazulen	–	–	–	+	+
β -kubeben	–	–	–	–	+
Germakren D	+	+	+	–	–
α -kubeben	+	–	–	–	–
kopfen	+	–	–	–	–
γ -selinen	+	–	–	–	
β -kariofillen	–	+	+	–	–
β -farnezen	–	+	0	–	–
α -pinen	–	+	+	–	–
α -humulen	–	+	+	–	–
β -bisabolen	–	+	–	–	–
Germacren B	–	+	–	–	–
α -kopaen	–	–	+	–	–
1,8-Cineol	–	–	+	–	–
δ -kadinen	–	–	+	+	–
Sabinen	–	–	+	–	–
α - Tuyon	–	–	+	–	–
α -kalakoren	–	–	–	+	–
α -kadinol	–	–	–	+	–
γ -muurolen	–	–	–	+	–
epi- α -muurolol	–	–	–	+	–
α -muurolen	–	–	–	+	–

Según Miguel (2015) en su trabajo titulado *Aspectos químicos y bioactivos de tres matrices naturales: Calendula officinalis L., Mentha cervina L. y Macrolepiota procera (Scop.) Singer*, donde hizo una caracterización química muy completa sobre la planta de *Calendula officinalis L* indica que esta posee Flavonoides en una proporción menor a 1.5 % su estructura se muestra en

la figura 5, ácidos fenólicos libres y esterificados 0.1%, taninos entre 6 y 10%, cumarinas, alcoholes triterpenicos libres y esterificados menos del 5%, glicosidos triterpenicos del 2 al 10%, esteroides y esteroles 0.2%, monoterpenos y sesquiterpenos del 0.2 al 0.4%, carotenos entre 3-5%, carbohidratos entre el 12 y 25%, ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, málico y ácido salicílico entre otros, ácidos grasos 5%, aminoácidos, proteínas y minerales como potasio (k), magnesio (Mg), y calcio (Ca) entre otros.

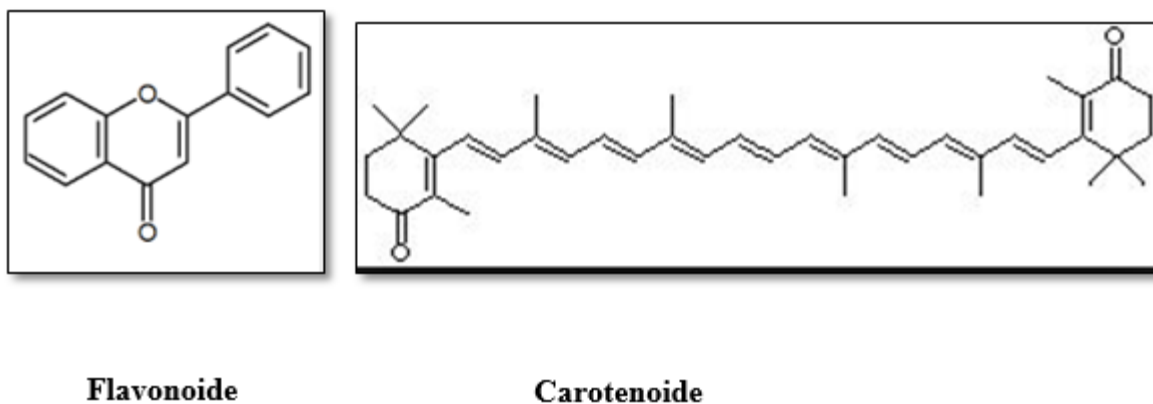


Figura 5. Estructura química de los flavonoides y carotenoides

2.2 Información a nivel Colombia: cultivos, variedades, mercado (oferta y demanda).

La caléndula se encuentra dentro de las plantas medicinales aprobadas para su cultivo en Colombia.

Según el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt en su documento sobre Biocomercio Sostenible, dice que de las plantas aromáticas que se cultivan en Colombia la que tiene una mayor Comercialización es la *Calendula officinalis* L., con un 26,9% y que es empleada por el 72% de los laboratorios del país debido a las diversas propiedades que posee, es cultivada en municipios como La Vega, Albán, Villeta y Tocaima y los precios que se tienen en este documento con vigencia 2001 se encontraban entre \$1.500 y \$16.000 por kilogramo , la planta que le sigue es la Alcachofa (*Cynara scolymus*) con un 23,1% y la valeriana (*Valeriana officinalis* l.) con 19,2%.

2.3 Investigaciones sobre la caléndula.

(Miguel, 2015) En su trabajo sobre los Aspectos químicos y bioactivos de tres matrices naturales: *Calendula officinalis* L., *Mentha cervina* L. y *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer, hace una caracterización de estas tres especies de plantas, en donde enfatiza en las aplicaciones, farmacología, caracterización química y nutricional, actividad antioxidante y antitumoral de estas especies, encontrando que la *Calendula officinalis* L. tiene mayor contenido en cenizas y en grasas (14 g/100 g y 6 g/100g, respectivamente) frente a la *M. cervina*, que tiene trece compuestos diferentes, como flavonoles glicosilados, tiene cinco azúcares libres (xilosa, fructosa, glucosa sacarosa y trehalosa), ácidos orgánicos se encontró para *Calendula officinalis* (2830 mg/100 g, planta; 3,0 mg/100 mL infusión), siendo el ácido cítrico el mayoritario (963 mg /100 g, planta; 2,6 mg/100 mL infusión), *Calendula officinalis* mostró una relación de ácidos grasos totales: SFA>PUFA>MUFA, donde son mayoritarios los ácidos grasos saturados (76 %) Los ácidos grasos mayoritarios en la caléndula fueron el ácido palmítico (C16:0, 36 %) y el ácido mirístico (C14:0, 25 %) y en cuanto a la bioactividad encontró que la *calendula officinalis* L. tiene una mayor actividad antioxidante con respecto a las otras plantas estudiadas, y que El extracto hidrometanólico de *Calendula officinalis* presenta actividad frente al carcinoma cervical (HeLa, GI50 = 256 µg/mL), siendo su mayor actividad, y frente al carcinoma hepatocelular (HepG2).

2.4 Aceite esencial de *calendula officinalis* L.

El aceite esencial de *calendula officinalis* L., es de aspecto líquido, no muy viscoso, con olor característico de la planta, su color es amarillo claro.

Dentro de sus propiedades se destacan que son de tipo medicinal con alta actividad terapeutica como antiinflamatorio, antitumorigenico y cicatrizante, (Okoh, Sadimenko, Asekun, & Afolayan, 2008), propiedades antisépticas (Lastra, & Piquet, 1999), acciones que aceleran la regeneración de tejidos y epitalización, acción antimicrobiana y antiedematosa. El aceite esencial extraído en Uzbekistán tiene una acción anti-infecciosa debido a sus componentes. (Abdullabekova, *et al.*,

2014), actividad antibacteriana contra la *Escherichia coli*, y actividad anti fúngica contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y cepas de hongos patógenos y tóxicos. (Dominguez, 2012)

2.5 Composición química del aceite esencial de *calendula officinalis* L.

La planta de la caléndula tiene entre un 0,2 a 0,3% de aceites esenciales los cuales están compuestos por taninos, luteína, xantofila, alcoholes tripenicos y ácidos fenólicos.

Según (Abdullabekova, *et al.*, 2014), (Salomé, *et al.*, 2015) y (Domiguez, 2012) los cuales dentro de sus investigaciones tienen los compuestos químicos del aceite esencial de caléndula coinciden en los siguientes α -kardiner, β cubenben, α cubenben, δ cadinene, 1-8 cineol, geranil acetona, α cadinene, δ cadinene, α cadinol, α muuroleno, γ y δ cadineno, calendulósido.

Otros compuestos identificados por estos autores son: carvona, iononas, mentona, isomentona, cariofileno, γ terpineno, pedundulatina, dihidroactidiólido, quercetina, α y β amirina, arnidiol, carotenos, xantofilas, taninos, borneol, cis-carveol, α selineno, oxido cariofileno, ledol, 2,3,5,6-tetrametil-p-fenileno, timol, entre otros compuestos que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.

Compuestos identificados en el aceite esencial de caléndula (Domiguez Marín, 2012)

COMPUESTO IDENTIFICADO
α -cadinol (25%)
la mentona, isomentona, terpineno, g-muuroleno, a-cadineno, cariofileno, peduncolatina, a y b ionona, dihidroacnidiolido, carvona, geranilacetona, cariofilenocetona, sesquiterpenos (epicubebol, aloaromadendrol), oxido-transcariofileno, b-ionona-5,6-epóxido, dihidroactinidiolido, guaiol y torryol.
Timol, α -cubebeno, (8) α -copaeno, (-)- α -grujueno, (7) β -Cariofileno, β -grujueno, α -humuleno, cis-4-muurola-5-dieno, (5) γ -muuroleno, D-germacrene, β -ionona, ledeno, α -muuroleno, γ -cadineno, cadina-1,4-dieno, α -cadineno, α -calacoreno, ledano, ledol, cubenol, T-cadinol+T-muurolol, β -eudesmol, (4) α -cadinol, ácido hexadecanioco, 2-pentadecanona, heptadecano, octadecano, nonadecano, n-eicosano.

2.6 Extracción aceite esencial de caléndula

De acuerdo a la revisión de la literatura, se han empleado varios métodos para la extracción del aceite esencial caléndula en cada uno de ellos se ha determinado el rendimiento de extracción y la calidad del aceite obtenido. El método más empleado es la hidrodestilación que en un alto número de extracciones, es tomado como referente; otros métodos que se clasifican como convencionales también han sido empleados, por ejemplo en la Investigación de (Salomé *et al.*, 2015), obtuvieron el aceite esencial mediante tres técnicas a saber: Hidrodestilación, extracción solventes orgánicos y enfleurage, sus rendimientos respectivamente fueron de 0.9 ± 0.1 , 6.7 ± 0.2 , 7.1 ± 0.15 gramos de aceite por 100 gramos de materia floral seco; los tiempos requeridos para cada método fueron respectivamente 2 horas, 15 minutos y 20 minutos, donde el máximo rendimiento de aceite se obtuvo en el método de enfleurage con 7.1 gramos de aceite por 100 gramos de muestra en 20 minutos; en esta misma investigación la calidad del aceite fue evaluado por GC-MS donde se identificaron los componentes del aceite esencial obtenido por cada método, hidrodestilación (19 compuestos), extracción con solventes orgánicos (15 compuestos) y enfleurage (11 compuestos), en los tres los mayores componentes obtenidos fueron de α cadinene y δ cadinene; en los métodos de extracción con disolventes orgánicos y enfleurage se obtuvieron pigmentos lo cual hacía menos puros los aceites esenciales extraídos a diferencia del obtenido mediante hidrodestilación aunque este tiene una gran diferencia en cuanto al tiempo de extracción el cual fue de 2 horas.

2.7 Métodos para la extracción esencial de *calendula officinalis* L. en la experimentación

2.7.1 Hidrodestilación (HD)

El proceso de extracción por hidrodestilación es llamado en algunas veces como “destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodestilación, hidrodifusión o hidroextracción” (Cepa C., 2007). Su principio consiste en llevar el agua contenida en un recipiente a la temperatura de ebullición, el material vegetal se encuentra en suspensión acuosa, los vapores generados son condensados y recogidos mediante la trampa de Clevenger.

En la hidrodestilación el agua junto con el material vegetal (que puede estar en trozos, molida, y pueden ser las flores, hojas, tallos de la planta) van en un recipiente el cual puede ser un balón como se muestra en la figura 6, la generación del calor se hace en el interior del recipiente por medio de una placa calefactora, a medida que el vapor entra en contacto con la materia vegetal esta se calienta y libera diversos componentes volátiles entre los que se encuentra el aceite esencial, dichos componentes son arrastrados junto con el vapor, esta mezcla es llevada a un condensador donde se enfría lo que hace que caiga en la trampa de Clevenger, la cual permite separar el aceite esencial debido a que este es inmiscible en agua y ya que este es más denso que el agua flota en la superficie y puede ser fácilmente decantado, el vapor condensado recibe los nombres de agua floral o hidrolato y contiene algunos compuestos químicos de la planta y el aceite esencial. El agua que va en el recipiente junto con el material vegetal debe ser suficiente para que en el proceso no ocurra un sobrecalentamiento a la muestra con lo cual se podría carbonizar y producir efectos adversos al aceite esencial (como malos olores y formación de compuestos no deseados debido a la combustión). (Perez, 2014), el proceso termina cuando el volumen de aceite esencial que se va recolectando en la trampa de Clevenger no tiene ninguna variación con respecto al tiempo.

Este método es el más común y se considera como convencional para la extracción de aceites esencial, en la actualidad se presentan varias desventajas en este método los cuales son:

- Requiere de un tiempo muy largo para realizar la extracción.
- Pérdida de compuestos volátiles, debido a las altas temperaturas.
- Temperaturas elevadas que pueden degradar algunos compuestos como los monoterpenos.
- Altos costos debido al tiempo que requiere y el alto costo energético.

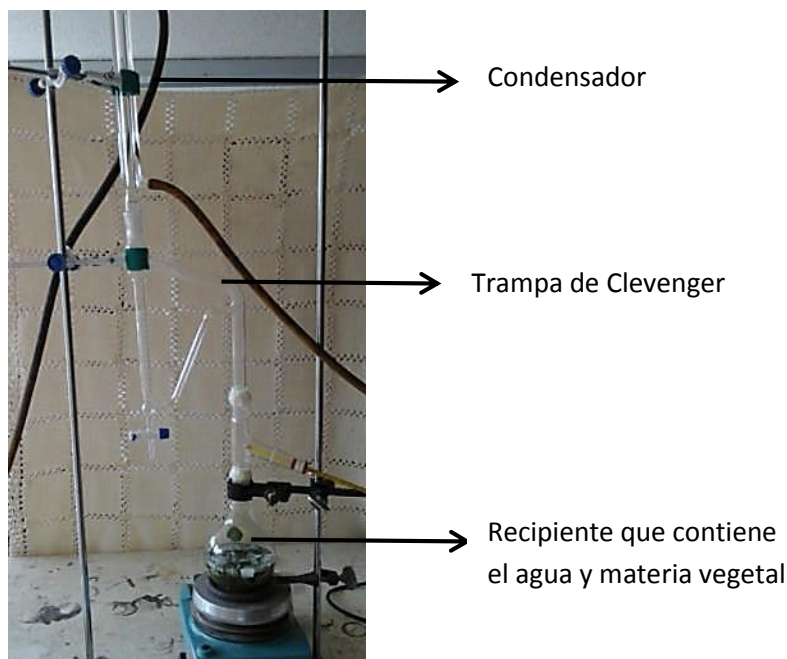


Figura 6. Equipo de hidroddestilación a nivel laboratorio.

2.7.2 Calentamiento óhmico asistido por hidroddestilación. (OAHD)

Consiste en un proceso emergente el cual no requiere de una fuente de calor externa para generar calor, en este proceso una corriente alterna es la que genera el calor dentro del producto; este calor se produce en forma de transformación de la energía interna (de energía eléctrica a térmica por el efecto Joule) es por ello que el calentamiento y extracción se produce de una forma rápida en comparación con otros métodos como la hidroddestilación que puede requerir un tiempo hasta de 3 horas, mientras que en calentamiento óhmico el tiempo es de unos pocos minutos o segundos lo cual hace que este método tenga una relevancia a nivel industrial (figura 7).

El calentamiento óhmico asistido por hidroddestilación presenta grandes ventajas en cuanto al tiempo de extracción (el cual es menor), calidad del aceite esencial obtenido el cual conserva sus componentes (ya que no hay degradación térmica) y a que la temperatura dentro del sistema aumente rápidamente esto es debido al efecto de la electroporación y calentamiento interno de las vacuolas que contienen el aceite esencial.(Damyeh, & Niakousari, 2016); los rendimientos de extracción por este método son mayores a los que se obtienen por otros métodos como el HD, por causa de la permeabilización de los tejidos vegetales, y perturbaciones eléctricas a las

membranas de las células permitiendo la extracción de componentes bioactivos como el aceite esencial.

Presenta algunas ventajas con respecto a los métodos convencionales como:

- Calentamiento efectivo
- Rápida transferencia de energía.
- Menor tiempo de extracción lo que beneficia los costos de producción de aceites esenciales disminuyéndolos.
- No hay alteraciones en la composición química del aceite esencial
- Amigable con el medio ambiente lo que lo hace ser una tecnología verde emergente.

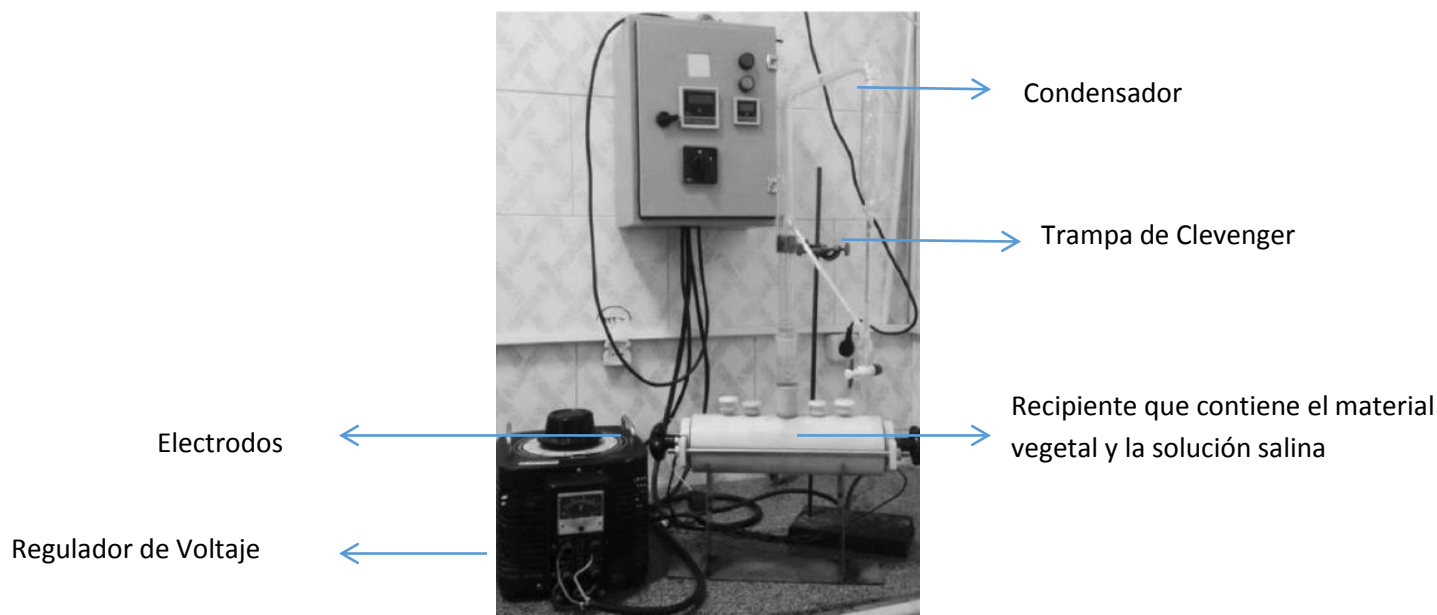


Figura 7. Equipo de calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (Damyeh, & Niakousari, 2015)

El calor en el OAHD no se produce por gradientes térmicos de tipo conducción o convección como en los métodos convencionales; en este caso depende de la conducción térmica (debido a que la energía eléctrica produce calor en el interior del material vegetal), por este motivo el calor se produce de una forma más rápida y homogénea.

En la actualidad este método de extracción ha sido de gran interés para su estudio en procesamientos de alimento y bioprocesos, debido a que se ha demostrado que no altera la composición nutricional, funcional y estructural de los productos con respecto a otros métodos

convencionales (Pereira, *et al.*, 2016), además de estas ventajas debido al consumo de energía, contribuye a la no contaminación del medio ambiente debido a que se reduce el uso de recursos no renovables.

Para este método se deben tener en cuenta varios parámetros entre los que se encuentran la medición de la conductividad eléctrica de la matriz vegetal, cuando esta es muy baja se hace necesaria la adición de una carga eléctrica (para que se dé la movilización iónica que permite el calentamiento) mediante una solución salina que puede ir en concentraciones del 0,3 al 1% dependiendo de la conductividad eléctrica de la materia vegetal con que se esté trabajando; otro parámetro es la medición del voltaje, intensidad de la corriente y temperatura (que permiten evaluar la eficiencia del sistema y consumo de energía).

2.8 Modelamiento de la cinética de extracción

El modelamiento de la cinética de extracción se hace matemáticamente dependiendo del método de extracción usado y de los fenómenos de transferencia de masa y calor que se quiera evaluar dentro del proceso; para poder entender el fenómeno que ocurre en el proceso de extracción, mediante el modelamiento se explican los mecanismos de extracción (como por ejemplo se pueden determinar los parámetros que hacen posible la electroporación en el caso del OAHD); cuando se comparan dos métodos de extracción o se desea conocer el comportamiento de uno de ellos, permite observar que proceso es más efectivo de acuerdo a las variables evaluadas.

En la revisión de la literatura, se encontró, que existen varios modelos matemáticos de cinéticas de extracción, varios basados en la ley de Fick, modelamientos empíricos, mediante balances de materia, modelos cinéticos de primer y segundo orden; Siemeonov, E. *et al.* , (1999) explican un modelamiento en una extracción sólido-líquido, basado en la difusividad y porosidad del material vegetal, mediante el modelamiento matemático obtuvieron la efectividad del coeficiente de difusión; Stanojevic, L. *et al.*, (2011) en su investigación proponen un modelamiento analítico para el modelamiento de la cinética de extracción por hidrodestilación definido como $\frac{q_0 - q_i}{q_0} = b + kt$ donde mediante curvas donde graficaron $\frac{q_0 - q_i}{q_0}$ versus tiempo determinaron las 2 etapas que ocurren en el proceso; primera etapa, el aceite que se encuentra en la superficie de las células

es más fácil de extraer y se evapora de forma rápida; segunda etapa, la difusión del aceite esencial desde el interior de la células por lo cual la extracción se hace de forma más lenta; Armijo, J. *et al.*, (2012) explican un modelamiento del proceso de extracción mediante destilación por arrastre de vapor, basado en el de Dunckhorst-Houghton con varias suposiciones para simular el proceso por medio de expresiones matemáticas, balances de materia, modelos de Dunckhorst-Houghton y Lapidus-Amundson, analizan los procesos que ocurren en la extracción (adsorción y desorción). En el modelamiento expuesto por Kusuma & Mahfud, (2016) se basaron en un modelamiento de segundo orden $\frac{dCt}{dt} = k(Cs - Ct)^2$ para el modelamiento de la cinética de extracción po, las variables que se derivan de están ecuaciones son K constante de velocidad de extracción, Cs concentración del aceite en la saturación, Ct concentración de aceite en la solución en cualquier momento, en otra investigación de los mismos autores presentan un modelamiento basado en las transferencias de calor y masa que ocurren en el proceso de tres métodos de extracción (microondas asistido por hidrodestilación MAHD, fluidos supercríticos SFME comparados con la hidrodestilación HD) donde llegaron a la conclusión que por el método de MAHD existe una sinergia debido a 2 fenómenos de transferencia (calor y masa) que ocurren en el mismo sentido, el modelamiento fue importante para comparar los resultados obtenidos con los del modelamiento en ciertos parámetros como el incremento de la temperatura, rendimiento y las fases que ocurren en los procesos de extracción.

3. METODOLOGÍA.

Las pruebas experimentales se llevaron a cabo en los laboratorios de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, CEAD Duitama.

MATERIALES

3.1 Materia prima vegetal

Se adquirieron de manera comercial las plántulas de *Calendula officinalis* L., del invernadero del SENA CEDAGRO Duitama Boyacá, con 68 días de germinación (Figura 8) luego de este tiempo fueron trasplantadas con los requerimientos climáticos y agronómicos respectivos.



Figura 8. Plántulas en germinación Invernadero SENA CEDAGRO.

Las plantas de caléndula *Calendula officinalis* L. Fueron cultivadas hacia el mes de noviembre del año 2015 en el municipio de Tibasosa Boyacá, a una altitud de 2.538 m.s.n.m, una humedad del 50% y una temperatura media de 16°C (Figura 9).

Para la siembra se utilizaron abonos orgánicos, compost y cascarilla de arroz. El riego fue diario (2 veces al día) y en etapa de floración día de por medio, el cultivo fue cubierto con polisombra de alta densidad para evitar daños por causa de bajas temperaturas y ataque de aves e insectos.



Figura 9. Cultivo de flores de *Caléndula officinalis* L. en el municipio de Tibasosa (Boyacá)

Las flores de *Calendula officinalis* L., requieren de 16 semanas para su recolección, tiempo en el cual el cultivo presenta una gran proporción en estado de floración. El proceso se realizó de forma manual, se cortan las flores a unos 3.0 cm por debajo del pedúnculo e incluyendo los sépalos. La hora de recolección fue sobre el mediodía teniendo en cuenta que la flor estuviera completamente abierta (Figura 10).

Se verifico que las flores no llevaran partículas extrañas como tierra o insectos y se empacaron de forma inmediata en bolsas Ziploc de 500 gr. con posterior congelación convencional para conservar su vida útil por un mayor tiempo, mientras se hacían las respectivas pruebas.



Figura 10. Recolección del material vegetal. (1) corte de la flor, (2) empaque bolsas Ziploc, (3) almacenamiento congelación.

3.2 Aceite esencial de *Calendula officinalis* L

Se obtuvo de manera comercial distribuida por Inali, Riviere Villamizar y cia S e importado de Alemania el cual tiene las especificaciones que se muestran en la tabla 6, y sus usos son en cosmética, perfumería, farmacia, aromaterapia.

Tabla 6.

Especificaciones Aceite esencial de Calendula officinalis L.

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN
Apariencia	Líquido incoloro
Densidad relativa	0,865-0,885
Índice de refracción IR	1.462 – 1,472
Rotación óptica	+10 a -10
% de linalol	60% - 70%

4. METODOS

4.1 Métodos de caracterización de la materia prima

En el anexo 1, se presentan los respectivos protocolos de laboratorio para cada determinación de la caracterización de la materia prima.

Se realizó la caracterización para determinar:

Porcentaje de humedad: siguiendo el método descrito en AOAC, 1990/ 964.22., (figura 4.)

Cenizas: Se determinaron cenizas totales según el método A.O.A.C., 923.03, 1990; cenizas solubles en agua de acuerdo a AOAC 14 th Ed. 31.015; cenizas solubles en ácido clorhídrico (HCl) según lo recomendado por el Instituto de Salud Pública de Chile (prt-711.02-009 método gravimétrico) (Figura 11).

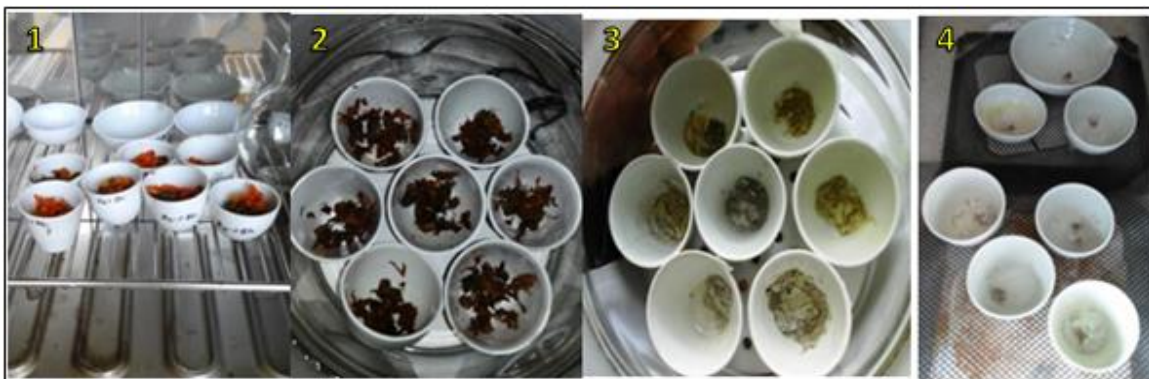


Figura 11. Determinación porcentaje de humedad y cenizas. (1) Porcentaje de humedad, (2) cenizas totales, (3) Cenizas en agua, (4) Cenizas en HCl

Porcentaje de grasa o extracto etéreo: método Soxhlet de acuerdo a lo estipulado AOAC 920.39. El equipo se muestra en la figura 12.



Figura. 12 Equipo de extracción Soxhlet.

pH: El pH de las muestras de *caléndula officinalis* L. se realizó de acuerdo al método AOAC 981.12 edición 2010 , se empleó un pHmetro marca Phywe con previa calibración cada 5 determinaciones (Figura 13).



Figura 13 Medición del pH equipo Phywe

Marcha fitoquímica cualitativa flor *Calendula officinalis* L.: se realizó para determinar sobre los extractos florales taninos, flavonoides, fenoles, quinonas, y leucoantocianidas. De acuerdo a los protocolos expuestos por *Calle y Jiménez, (2002)*.

Proceso de secado de las flores: Las flores de *Calendula officinalis* L. fueron deshidratadas en horno donde la temperatura oscilo entre 48°C- 56°C, por 72 horas de acuerdo a *Rodríguez, Alcaráz, & Real, (2012)*.

Las flores secas se guardaron en bolsas Ziploc de 500 gr en un sitio fresco con control de humedad, oscuro y a una temperatura de 18°C para evitar que las flores ganaran humedad y se dañaran por causa de hongos, mientras se utilizaban en las posteriores pruebas (Figura 14).



Figura 14. Proceso de secado flores (1) secado en horno, (2) empaque flores de *caléndula officinalis* L, (3) almacenamiento flores secas.

4.2 Extracción del aceite esencial

A continuación se describe el procedimiento detallado para la extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L.

4.2.1 Curva de calibración mezcla aceite-hexano

El protocolo para determinar la cinética de extracción lleva a determinar por fracciones de tiempo la cantidad de aceite que se obtiene; dado que las cantidades son tan pequeñas no fue efectivo recoger y secar los aceites sobre sulfato de sodio anhidro, sino que se adaptó el método de determinar la cantidad del aceite esencial de *Calendula officinalis* L. Haciendo un seguimiento del volumen obtenido mediante índice de refracción por tiempo, método que requiere hacer una curva de calibración por refractometría con un solvente adecuado. Para determinar el índice de refracción de la mezcla aceite-solvente por unidad de tiempo, se realizaron pruebas de solubilidad con el aceite esencial de *Calendula officinalis* L obtenido de manera comercial; los resultados se exponen en la figura 15.





Solubilidad en agua		Solubilidad en el aceite	
			
Agua con Hexano	Agua con <u>Diclorometano</u>	Aceite con hexano	Aceite con <u>Diclorometano</u>
Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble

Figura 15. Prueba de solubilidad del aceite en agua, Hexano y Diclorometano

A partir de la prueba de solubilidad se decidió elaborar la curva patrón de índice de refracción con hexano debido a que presentó mejor solubilidad (solo se observó una sola fase), y, en las paredes del tubo de ensayo no se observó adherido el aceite; criterio importante para evitar pérdidas de aceite en la cuantificación del aceite esencial de *calendula officinalis* L. La curva aceite-hexano se construyó preparando soluciones a diferentes concentraciones conocidas, midiendo el índice de refracción asociado a cada uno. Los índices de refracción fueron corregidos a temperatura de 20°C, en el anexo 2 se presenta el protocolo para la curva calibración por índice de refracción Aceite-Hexano.

4.2.2 Hidrodestilación

La hidrodestilación fue llevada a cabo usando un equipo destilador con trampa de Clevenger de acuerdo a lo recomendado por United States Pharmacopoeia, USP 32 NF27, con modificación en el recipiente donde se coloca la muestra, empleando una olla a presión comercial, la cual se le acondiciono una manguera plana de alta calidad, flexible de 3/8 y con una longitud de 8 cm; en la parte superior de esta, se conecta a una trampa en forma “Y” con salidas esmeriladas,

(Figura 16), en una de estas salidas, se une a la trampa de Clevenger para facilitar el paso del vapor generado en el recipiente, llegando hasta un condensador para permitir el intercambio térmico y recuperación del condensado en la trampa de Clevenger para luego dar inicio a una recirculación del hidrolato y acumulación del aceite. Este proceso se realizó en 180 minutos. Al montaje fue acoplado un termómetro para llevar registro y control de la temperatura del proceso. 300 g de muestra fresca se colocaron en el recipiente de extracción con 500 ml de agua destilada; para las flores secas se trabajó con la misma cantidad de muestra pero el proceso requirió aumentar el volumen del agua a 1000 mL. Para determinar el volumen de aceite obtenido se recogieron las fracciones de aceite-hexano, la primera hora se tomaron cada 3 min, y después cada 7-8 minutos hasta finalizar la extracción.

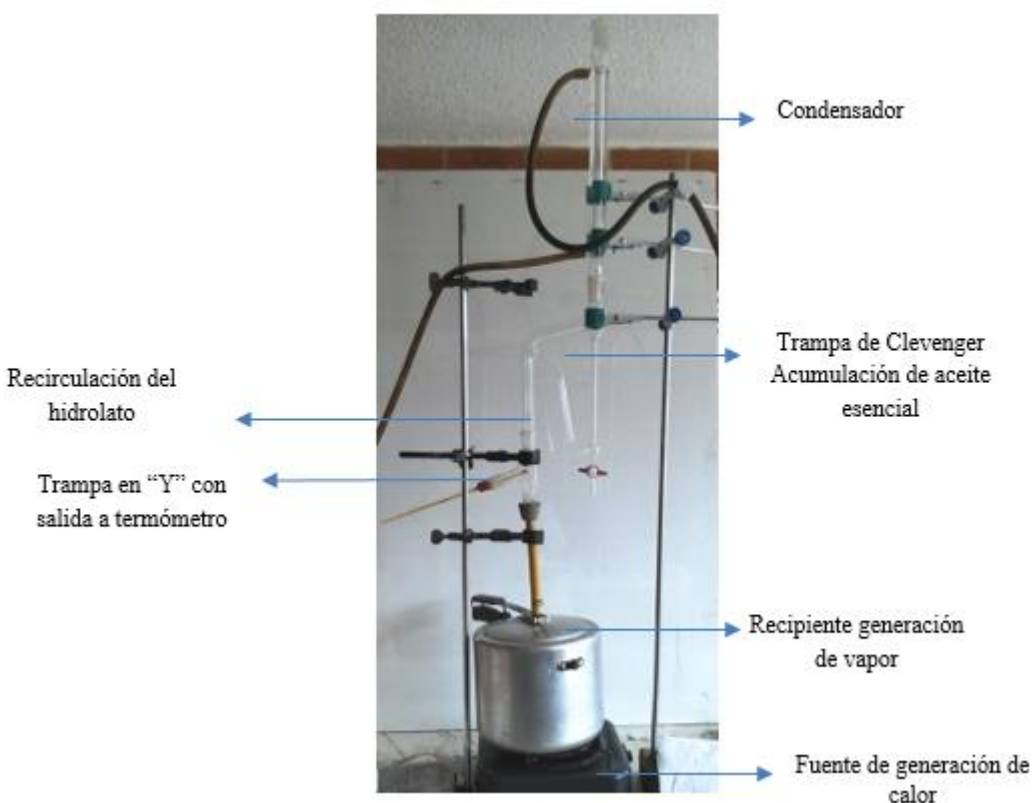


Figura 16. Montaje hidroddestilación a nivel laboratorio

4.2.3 Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación.

Diseño del equipo: El sistema de calentamiento óhmico fue diseñado y fabricado por el equipo de ingenieros de la Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería (ECBTI) del Cead de Duitama. El sistema de calentamiento óhmico consistió en un cilindro en Nylon cuyo diámetro interno 30,5 mm y longitud 168 mm para una capacidad de 490 mL, y un soporte en acero inoxidable con referencia comercial 304; se adaptaron dos electrodos de acero inoxidable de la misma referencia, para la hermeticidad del equipo se adaptaron empaques siliconados y unas abrazaderas en acero inoxidable (Figura 17).



Figura 17. Partes equipo de calentamiento óhmico

El calentamiento óhmico requiere del seguimiento de la corriente eléctrica aplicada, para ello se requirió el uso de un multímetro digital marca Minipa ET 2082B, protección de sobrecarga, alta estabilidad y confiabilidad, CAT II 1000V, de una pinza amperimétrica digital marca Minipa ET-3880, categoría de sobrevoltaje III1000V y de un autorregulador de voltaje con las siguientes especificaciones: Fabricante: IngelParra Rango de tensión entrada: 150 V- 260 V Frecuencia: 50/60 Hz Nombre: Regulador de voltaje Eficiencia: 95% Tensión de salida 110V / 220V (Figura 18).



Figura 18. A. Multímetro digital, B. Pinza amperimétrica digital, C. Auto-transformador de Voltaje de 0 a 220 V

El equipo se trabajó a 166 V y con amperaje en promedio de 1,9 A. Se llevó registro y control de temperatura mediante un termómetro bimetálico de lectura instantánea de 0 ° C a 110 ° C. En la parte superior se adaptó una trampa en forma de “Y” con salidas esmeriladas, seguida de la trampa de Clevenger y condensador (Figura 19). De ahí en adelante el proceso de separación se llevó a cabo como se describió para la hidrodestilación. De acuerdo a la capacidad del equipo se trabajó con 100g flores frescas y 150 mL de solución salina (1% de NaCl) de acuerdo a Gavahian, *et al.*, (2015); Debido a la capacidad de absorción de agua del materia vegetal seco se redujo la cantidad de muestra a 50g de flores secas con 200 mL de solución salina (1% de NaCl). La solución de cloruro de sodio (NaCl) se emplea para aumentar la conductividad de la muestra y permitir el calentamiento. Después de que el proceso alcanzó la temperatura de ebullición, se recolectó durante los primeros 15 minutos el aceite esencial en intervalos de 4 minutos, después en intervalos de 8 minutos hasta terminar la extracción.

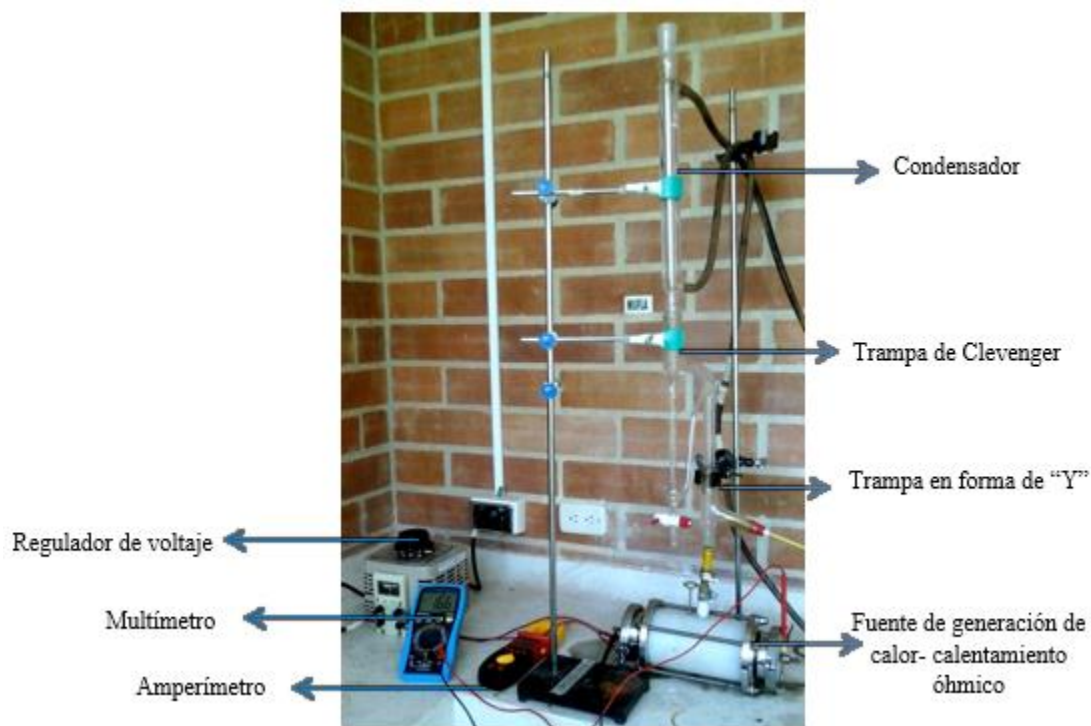


Figura 19. Montaje calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación a nivel laboratorio

4.3 Parámetros cinéticos

La cinética de extracción relaciona:

- **Incremento de la temperatura $^{\circ}\text{C}$ hasta la ebullición (min):** se calculó mediante registro de temperatura desde el tiempo cero (0) hasta el tiempo en que el sistema alcanzó la temperatura de ebullición del agua (89°C) de acuerdo a la presión atmosférica y ubicación geográfica del lugar de la experimentación; en fracciones de un minuto después de los 5 minutos de calentamiento.
- **Velocidad de incremento de la temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$):** Se calculó graficando los valores del tiempo (min) versus la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y calculando la pendiente de la parte lineal de los datos.
- **Tiempo de acumulación del aceite (min):** Está asociada a la hora cuando comienzan a caer las primeras gotas del aceite esencial.

- **Tiempo total extracción (min):** corresponde al tiempo de extracción necesario para alcanzar el máximo rendimiento de aceite esencial.
- **Duración de la extracción (min):** es la diferencia entre el tiempo total de extracción y el tiempo de acumulación del aceite esencial.
- **Velocidad de acumulación de aceite esencial (mL/min):** Se obtiene dividiendo la cantidad de aceite esencial obtenido (mL) con el tiempo total de extracción (min).
- **Rendimiento (%v/w):** se expresa como porcentaje, es la relación de la cantidad de aceite esencial extraído (mL) con la cantidad de materia prima utilizada (g) por 100.

4.4 Modelamiento matemático cinética de extracción:

Se aplicó un modelo de segundo orden para los siguiente parámetros: rendimiento (%v-w) y velocidad de extracción de aceite (mL/min), siguiendo la ecuación:

$$\frac{dC_t}{d_t} = k(C_s - C_t)^2$$

Este modelo permite determinar Velocidad de extracción, constante de extracción, capacidad de extracción del aceite en saturación y la velocidad inicial de extracción.

4.5 Caracterización preliminar del aceite esencial de caléndula (*calendula officinalis L.*)

En el Anexo 3 se presentan los protocolos de laboratorios empleados para la caracterización preliminar del aceite esencial.

Índice de acidez: se llevó a cabo de acuerdo a (Aquino, 2012), se expreso mediante el número de miligramos (mg) de KOH necesarios para neutralizar la cantidad de ácidos grasos que contiene 1 gramo de aceite esencial (Figura 20).



Figura 20. Montaje determinación del índice de acidez

Densidad: se llevó a cabo a partir de la relación masa/volumen y se expresó en gramos por mililitro (g/mL)

Índice de Refracción: se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en la ISO R 280.

"Determination of the Refractive Index of Essential Oils". Se empleó un refractómetro de marca NOVEX Holland con control de temperatura (Figura 21).



Figura 21. Equipo de medición del índice de refracción NOVEX

Determinación de Fenoles totales: Se hizo por el método de Folin-Ciocateu con ácido tánico como estándar para proceder a elaborar la curva de calibración. Se siguió los parámetros

establecidos por (Paladino, s.f). Y se hicieron algunos ajustes al método presentados en PNT N°19 (2010), y (Ainsworth, & Gillespie, 2007). Las medidas de absorbancia se hicieron a una longitud de onda de 760 nm (figura 22).



Figura 22. Espectrofotómetro

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.1 Caracterización de la materia prima

Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación, sesgo estandarizado y curtosis.

5.2 Diseño experimental para la extracción de aceites esenciales

Para evaluar el efecto de los métodos de extracción sobre la cinética de extracción en la obtención del aceite esencial de *caléndula officinalis* L. se formuló un diseño factorial de 2x2 completamente aleatorizado con efectos fijos, considerando el tiempo como covariable.

El modelo estadístico apropiado es:

$$Y_{ijtr} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + t_1 + t_2 + \varepsilon_{ijr} \quad \left\{ \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n \end{array} \right.$$

Dónde Y_{ijtr} es cantidad de aceite producido por el método de extracción i , para el estado de la flor j , en el tiempo t , por el número de réplicas r ; μ media común; τ_i Estado de la flor, β_j método de extracción; j_1, j_2 Estado de la flor j_1 seca, j_2 fresca; $\tau\beta$ Interacción entre el estado de la flor y método-tiempo; i_1, i_2 Método de extracción i_1 hidrodestilación, i_2 calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación; t Tiempo de extracción t_1 flores secas, t_2 flores frescas; r Número de réplicas por tratamiento. Montgomery, (2000).

El diseño emplearán 2 métodos de extracción Factor A y B con dos (2) niveles como tratamientos (estado de la flor) y 3 réplicas por tratamiento (tabla 7); La matriz del diseño factorial se presenta en el anexo 4.

Tabla 7.

Combinación de tratamiento por grupo para la extracción del aceite esencial de calendula officinalis L.

	Covariable (tiempo)	Factor	Estado de la flor	
			Flores frescas 1	Flores secas 2
Métodos de extracción	t_0, \dots, t_n	A Hidrodestilación HD	A1B1.	A1B2.
	t_0, \dots, t_n	B Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación OAH	A2B1.	A2B2.

5.2.1 Cinética de extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L.

Para algunos parámetros cinéticos, específicamente para los resultados de Velocidad de incremento T° ($^\circ\text{C}/\text{min}$) y Velocidad de acumulación de aceite (mL/min), la parte lineal de los datos fueron ajustados a una regresión lineal en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.II para determinar las respectivas pendientes.

Para la discusión de resultados los datos se tabularon y procesaron a través del programa estadístico SPSS 24 para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad de la experimentación a través del análisis de varianza (ANOVA) a los siguientes parámetros: velocidad de incremento de la temperatura ($^\circ\text{C}/\text{min}$), velocidad de acumulación del aceite (mL/min), y rendimiento (%v/w). Las diferencias significativas se evaluaron a través de la prueba de Tukey para establecer cuál de los dos (2) métodos de extracción y niveles empleados se obtuvo la mayor cantidad de aceite. Algunos de los parámetros cinéticos como incremento de la temperatura ($^\circ\text{C}/\text{min}$), tiempo de acumulación del aceite (min), tiempo total de extracción (min) y duración de la extracción (min), se analizaron a través de medidas de tendencia central.

5.2.2 Hipótesis de investigación

El estado de la flor (fresco y seco) y los métodos de extracción: hidrodestilación (HD) y Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (OAHD) condicionan los parámetros cinéticos en la obtención y calidad del aceite esencial de *calendula officinalis* L.

5.2.3 Hipótesis estadísticas

Ho: Los parámetros cinéticos de la extracción del aceite esencial de caléndula (*calendula officinalis* L.) Obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas).

$$H_0: \mu_A = \mu_B$$

$$H_a: \mu_A \neq \mu_B$$

Ha: Los parámetros cinéticos en la extracción del aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación difieren entre sí (o por lo menos uno de los tratamientos es diferente).

Ho: Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la extracción del aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación, en flores secas y en flores frescas no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas).

$$H_a: \mu_{A1} = \mu_{A2} = \mu_{B1} = \mu_{B2}$$

$$H_0: \mu_{ij} \neq \mu_{ik} \text{ Para algún } j \neq k$$

Donde

M_{A1} Hidrodestilación (A), flor fresca (1); M_{A2} Hidrodestilación (A); flor seca (2); M_{B1} Calentamiento óhmico (B), flor fresca (1); M_{B2} Calentamiento óhmico (B), flor seca (2)

Ha: Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la extracción del aceite esencial de *caléndula officinalis* L. obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación, en flores secas y en flores húmedas difieren entre sí (o por lo menos uno de los tratamientos es diferente).

$$HA: \mu A1 \neq \mu A2 \neq \mu B1 \neq \mu B2$$

$$H0: \mu_{ij} \neq \mu_{ik}$$

H1 = Por lo menos el efecto de un método o el efecto del estado de la flor (fresco o en seco) es \neq de cero

5.2.4 Variables

5.2.4.1 Variables Independientes: gramos de materia prima (flores de *calendula officinalis* L.), estado de la flor, método de extracción, método de secado.

5.2.4.2 Variables Dependientes o de respuesta:

- Tasa de incremento de temperatura (°C/min)
- Velocidad de acumulación del aceite (ml/min)
- Tiempo total de extracción (min)
- Rendimiento de extracción del aceite esencial (ml de aceite esencial/100 gramos de muestra)
- Cinética de extracción (% rendimiento/t(min))
- contenido de fenoles

Variables de Ruido: cosecha o corte de las flores de caléndula, tamaño de las flores, heterogeneidad del peso por flor de caléndula.

5.2.4.3 Condiciones fijas

Las cuales se controlan y son constantes

- Proceso de secado

- Hidrodestilación: Cantidad de muestra, cantidad de agua, especie y variedad de la materia prima, forma de adecuación de la materia prima, temperatura.
- Calentamiento óhmico: cantidad de voltios (160-220), amperios (1,8 A), frecuencia (60 Hz).

5.3 Caracterización preliminar del aceite esencial

Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación, sesgo estandarizado y curtosis.

5.4 Diseño factorial para la determinación del contenido de fenoles totales

Para evaluar el efecto de los métodos de extracción sobre el contenido de fenoles totales en la obtención del aceite esencial de *calendula officinalis* L. se formuló un diseño factorial de 2x2 completamente aleatorizado con efectos fijos. El modelo estadístico apropiado es:

$$Y_{ijr} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijr} \quad \left[\begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n \end{array} \right]$$

Dónde Y_{ijr} es cantidad de fenoles presentes en el aceite esencial de *calendula officinalis* L. al emplear un método de extracción i , para el estado de la flor j , por el número de réplicas r ; μ media común; τ_i Estado de la flor; β_j Método de extracción; $\tau\beta$ Interacción entre el estado de la flor y método; i_1, i_2 Método de extracción i_1 hidrodestilación, i_2 calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación; j_1, j_2 Estado de la j_1 seca, j_2 fresca, ε error experimental Montgomery, (2000).

El diseño empleara 2 tipos de aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido mediante 2 métodos de extracción Factor A y B; con dos (2) niveles (1 y 2) como tratamientos (estado de la flor) y 3 réplicas por tratamiento (tabla 8). La matriz del diseño factorial se presenta en el anexo 5.

Tabla 8.

Matriz de combinación de tratamiento por grupo para el contenido de fenoles.

	Factor	Estado de la flor	
		Flores frescas 1	Flores secas 2
Aceite esencial <i>calendula officinalis</i> L.	Aceite esencial <i>calendula officinalis</i> L obtenido mediante (A) Hidrodestilación HD	A1B1.	A1B2.
	Aceite esencial <i>calendula officinalis</i> L obtenido mediante (B) Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación OAHD	A2B1.	A2B2.

5.4.1 Contenido de fenoles del aceite esencial (µg/mL)

Para la discusión de resultados los datos se tabularon y procesaron a través del programa estadístico SPSS 24 para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad de la experimentación a través del análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas se evaluaron a través de la prueba de Tukey para establecer cuál de los aceites obtenidos por medio de los métodos de extracción y estado de la flor, se obtuvo mayor contenido de fenoles totales.

5.4.2 Hipótesis de investigación.

El aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido por hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación condiciona el contenido de fenoles totales presentes en el aceite esencial.

El estado de la flor condiciona el contenido de fenoles totales presentes en el aceite esencial.

5.4.3 Hipótesis estadísticas

Ho: El contenido total de fenoles (µg/mL) del aceite esencial de caléndula *Calendula officinalis* l. Obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas).

$$H_0: Z_A = Z_B$$

Ha: El contenido total de fenoles ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de caléndula *Calendula officinalis* l. Obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación, difieren entre sí (o por lo menos uno de los tratamientos es diferente).

$$H_A: Z_{A1} \neq Z_{A2} \neq Z_{B1} \neq Z_{B2}$$

$$H_0: Z_{ij} \neq Z_{ik}$$

Ho: El contenido total de fenoles ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de caléndula *Calendula officinalis* l. Obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación en flores secas y en flores frescas, no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas).

$$H_0: Z_A = Z_B$$

Ha: El contenido total de fenoles ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de caléndula *Calendula officinalis* l. Obtenido mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación, difieren entre sí (o por lo menos uno de los tratamientos es diferente).

$$H_A: Z_{A1} \neq Z_{A2} \neq Z_{B1} \neq Z_{B2}$$

$$H_0: Z_{ij} \neq Z_{ik}$$

Donde

Z_{A1} contenido de fenoles totales por Hidrodestilación (**A**), flor fresca (**1**); **Z_{A2}** contenido de fenoles totales por Hidrodestilación (**A**); flor seca (**2**); **Z_{B1}** contenido de fenoles totales por Calentamiento óhmico (**B**), flor fresca (**1**); **Z_{B2}** contenido de fenoles totales por Calentamiento óhmico (**B**), flor seca (**2**).

5.4.3.1 Variables

Variables Independientes: Aceite esencial de caléndula officinalis L, estado de la flor, método de extracción.

Variables Dependientes o de respuesta: Contenido de fenoles

Condiciones fijas: Las cuales se controlan y son constantes

- Proceso de secado
- Hidrodestilación (HD): Cantidad de muestra, cantidad de agua, especie y variedad de la materia prima, forma de adecuación de la materia prima, temperatura.
- Calentamiento óhmico asistido mediante hidrodestilación (OAHD): cantidad de voltios (220-166), amperios (1,9 A), frecuencia (60 Hz).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de la materia prima

Los resultados obtenidos de la caracterización de las flores de *calendula officinalis* L. se presentan en la tabla 9; en el Anexo 6 se presentan los datos según número de réplicas; en el Anexo 7 se presenta el resultado de las medidas de tendencia central. En la tabla 10 se presentan los resultados cualitativos (marcha fitoquímica) del extracto floral de *calendula officinalis* L.

Tabla 9.

Caracterización flores caléndula (*calendula officinalis* L)

^a media aritmética de los datos . Los números entre paréntesis corresponden a la desviación

Tratamiento	Parámetro							
	%humedad base húmeda	%humedad en base seca	Materia seca	% cenizas totales (A)	% cenizas HCl	% cenizas con agua	% grasa	pH flor de caléndula
Muestras de <i>calendula Officinalis</i> L	86.253 ^a	28.860 ^a	14.980 ^a	10.142 ^a	25.028 ^a	1.410 ^a	10.471 ^a	5.481 ^a
	(0.4060)	(1.1227)	(0.5173)	(0.4542)	(9.0507)	(0.4700)	(3.1184)	(0.0445)

estándar (n=7)

Tabla 10.

Caracterización fitoquímica extracto flores *calendula officinalis* L.

		Marcha fitoquímica cualitativa					
		Cloruro ferrico (taninos)	acetato de plomo (Fenoles)	Gelatina -Sal (fenoles)	Shinoda (Flavonoide s)	Leucoantocianidas	Quinonas
Marcha fitoquímica a cualitativa flores	Flores frescas	+	+	-	-	+	+
	Flores secas	+	+	-	-	+	+

6.2 Rendimiento de extracción del aceite esencial de caléndula (*calendula officinalis* L.)

Los resultados del contenido del aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (OAHD), fueron expresados en términos de rendimiento (%v/w), usando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} \left(\% \frac{v}{W} \right) = \frac{\text{ml de aceite obtenido}}{\text{gramos de materia vegetal seca}} * 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Para llegar a obtener los mililitros (mL) de aceite en cada extracción y por cada método de extracción, los datos fueron procesados con la ecuación (2), obtenida mediante regresión lineal a partir de los datos de concentración del aceite de referencia (%p-p) vs índice de refracción corregido a 20°C con la ecuación (3), figura 23.

$$\begin{aligned} Y &= mx + b \\ y &= 0,0011x + 1,3755 \quad \text{Ecuación (2)} \\ R^2 &= 0,9994 \end{aligned}$$

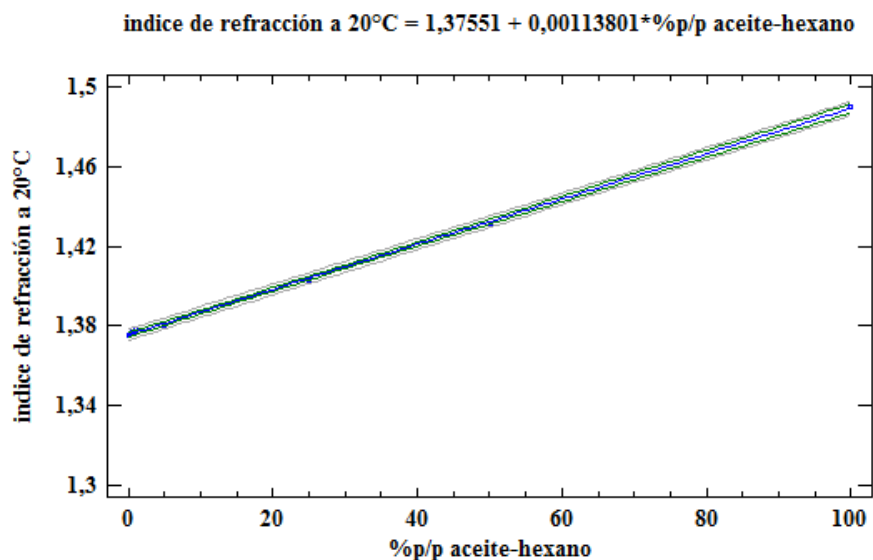


Figura 23. Curva patrón índice de refracción

$$IR = F (T_1 - T) \quad \text{Ecuación (3)}$$

A partir de la Ecuación (2) se obtuvo la cantidad de aceite esencial de *calendula officinalis* L. de cada extracción por fracción de tiempo en % p/p; a partir de este resultado se logró obtener el volumen (mL) de aceite al relacionar los gramos de aceite con su densidad mediante la ecuación (4), donde la pendiente corresponde al valor de la densidad en (g/mL).

$$Y = mx + b$$

Ecuación (4)

$$y = 0,8856x - 0,0124$$

$$R^2 = 0,9991$$

En el anexo 8 se presentan los resultados promedios del rendimiento (%v/w) obtenido mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (OAHD).

6.3 cinética de extracción del aceite esencial de *calendula officinalis* L.

En la tabla 11, se presentan los resultados de los parámetros cinéticos evaluados en la extracción del aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación. (OAHD). En el anexo 13 se puede revisar el estadístico completo en donde se detalla la media aritmética, las ANOVAS, test de Tukey, y medidas de tendencia central.

Tabla 11.

Parámetros cinéticos de la extracción de aceite esencial de calendula officinalis L.

	Hidrodestilación HD		Calentamiento óhmico asistido por Hidrodestilación OAHD	
	Ff	Fs	Ff	Fs
Incremento de la T° hasta ebullición (min)	19* (1.25)	20* (0.82)	5* (0.94)	2* (0.47)
Velocidad de incremento T° (°C/min)	5.7 ^a	3.8 ^{a-b}	16.2 ^{a-b}	38.0 ^{a-b}
Tiempo acumulación del aceite (min)	20* (6.24)	20* (4.08)	6* (15.71)	2* (23.57)

Tiempo total extracción (min)	42 ^{a-b}	90 ^{a-b}	15 ^{a-b}	45 ^{a-b}
Duración de la extracción	22* (1.25)	70* (0.82)	9* (0.94)	43* (0.47)
Velocidad de acumulación de aceite (ml/min)	0.0200 ^{a-b}	0.0069 ^{a-b}	0.0887 ^{a-b}	0.0293 ^{a-b}
Rendimiento bs % v/w	0.8251 ^{a-b}	0.5614 ^{a-b}	1.2499 ^{a-b}	1.2847 ^{a-b}

* Media aritmética de los datos. Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar (n=3)

^a indica que hay diferencias significativas $p \leq 0,05$, (n=3) .

^b indica que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de 0.05, según Teste de Tukey

En el anexo 9 se presentan los resultados estadísticos del análisis de varianza para cada parámetro cinético y en el anexo 10 se presentan sus respectivas medidas de tendencia central.

Los resultados del incremento de la temperatura hasta ebullición (min) se presentan en el anexo 11, la linealización del incremento de la temperatura se presenta en el anexo 12. La velocidad de incremento de la temperatura (°C/min) se obtuvo a partir de la pendiente de la parte lineal de cada gráfica derivada de los datos del anexo 11 y las gráficas se presentan en el anexo 13, para este parámetro se realizó la Linealización de los datos (figura 24) y se determinó la pendiente que relaciona el aumento de la temperatura (°C) por unidad de tiempo (min). En el anexo 9 se presentan los resultados de la aplicación estadística. El tiempo de acumulación del aceite (min) se obtiene a partir de la observación del desarrollo experimental cuando el sistema alcanzó la temperatura de ebullición (89°C en HD y 95°C OAHD) y se empezó a decantar la emulsión aceite-agua, que contiene las primeras gotas del aceite esencial. El tiempo total de extracción (min) se obtuvo a partir de los valores que se presentan en el anexo 8, cuando se alcanzó el máximo rendimiento de aceite esencial.

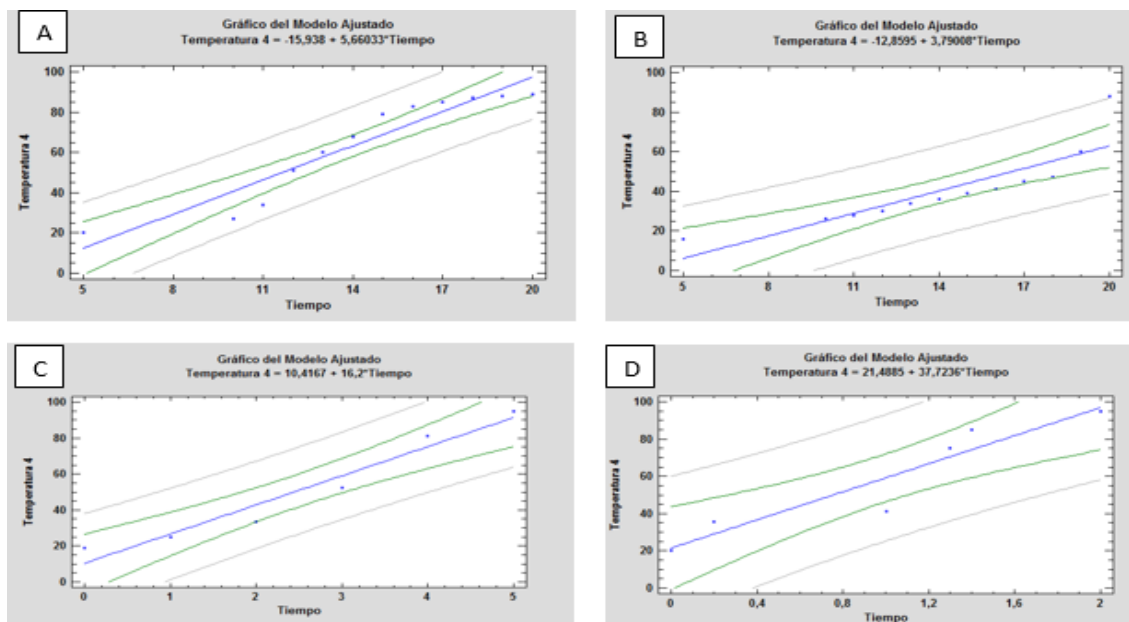


Figura 24. Linealización de datos del incremento de la temperatura (°C/min) (A) Extracción de flores frescas HD, (B) Extracción de flores secas HD, (C) Extracción de flores frescas OAHD, (D) Extracción de flores secas OAHD

Duración de la extracción (min), este valor fue obtenido por diferencia entre el resultado del tiempo total de la extracción y el tiempo de inicio de acumulación del aceite esencial de los valores obtenidos en la experimentación y que se presentan en el Anexo 8. Velocidad de acumulación del aceite esencial (ml/min), se obtuvo a partir de la pendiente de la parte lineal de cada gráfica derivada de los datos del anexo 8, para este parámetro se realizó la linealización de los datos (figura 25) y se determinó la pendiente que relaciona la cantidad del aceite esencial obtenido (mL) por unidad de tiempo (min); en el anexo 12 se presentan los resultados de la aplicación estadística.

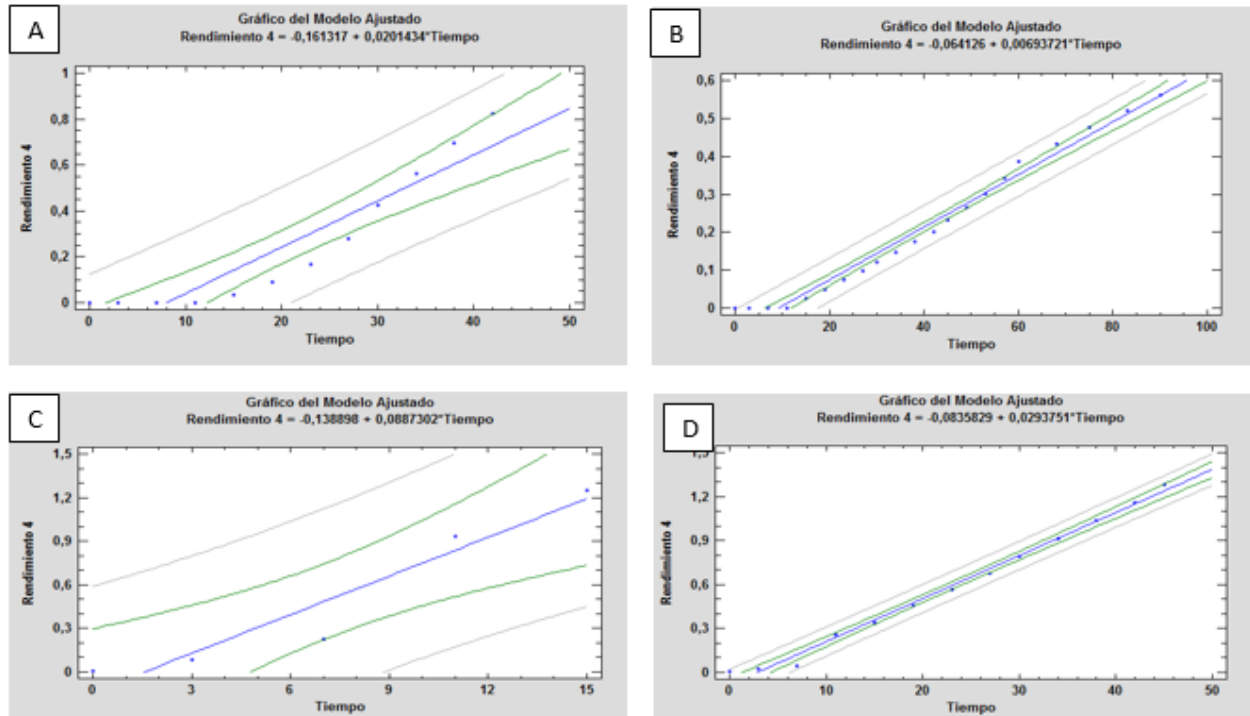


Figura 25. Linealización de datos de la velocidad de acumulación del aceite rendimiento (%v/w) por unidad de tiempo (min) (A); extracción de flores frescas HD (B); Extracción de flores secas HD (C); Extracción de flores frescas OAHd (D); Extracción de flores secas OAHd

6.4 Modelamiento matemático cinética de extracción

Para los métodos de extracción HD y OAHd se usó un modelo de segundo orden (ecuación 5), Velocidad de disolución del aceite contenido en el sólido a la solución.

$$\frac{dC_t}{dt} = k(C_s - C_t)^2 \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde: k constante de velocidad de extracción de segundo orden ($Lg^{-1} - min^{-1}$); C_s concentración de aceite en la saturación (gL^{-1}); C_t concentración de aceite en la solución en cualquier momento (gL^{-1}) t (min).

Integrando la (ecuación 1) y considerando la condición de $t = 0 - t$ y $C_t = 0 - C_s$ (ecuación 6)

$$C_t = \frac{C_s^2 Kt}{(1 + C_s kt)} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Forma lineal de la (ecuación 6), ecuación 7

$$\frac{t}{C_t} = \left(\frac{1}{kC_s^2} \right) + \left(\frac{t}{C_t} \right) \quad \text{Ecuación (7)}$$

Velocidad de extracción, ecuación 8

$$\frac{C_t}{t} = \left(\frac{1}{1/kC_s^2 + t/C_s} \right) \quad \text{Ecuación (8)}$$

Velocidad inicial de extracción, h, cuando t se aproxime a 0, ecuación 9

$$h = kC_s^2 \quad \text{Ecuación (9)}$$

Reordenando la ecuación 7, la concentración del aceite esencial en cualquier tiempo, ecuación 10.

$$C_t = \frac{t}{(1/h) + (t/C_s)} \quad \text{Ecuación (10)}$$

A partir de la gráfica de t/C_t , versus t, las velocidad de extracción h, capacidad de extracción C_s , y la constante de extracción de segundo orden k, las cuales pueden ser calculadas experimentalmente, a partir de la ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

Dónde: m es $1/C_s$, b es $1/kC_s^2$.

Los resultados del modelamiento se muestran en la tabla 12, la comparación entre el modelamiento y los resultados experimentales se muestran en la tabla 13, el análisis estadístico y comparación de medias se encuentra en el anexo 14, los resultados del modelamiento de la cinética de extracción se presentan en el anexo 15.

Tabla 12.

Modelamiento cinética de extracción aceite de calendula officinalis L.

	a= 1/Cs	(min Lg ⁻¹)	Cs (gL ⁻¹)	h	K	R ²
Flores frescas HD	0,0415	0,6909	2,372	1,448 ⁻⁰⁴	2,5725 ⁻⁰⁵	0,9983
Flores secas HD	0,03647	0,5418	2,742	1,849 ⁻⁰⁵	2,45898 ⁻⁰⁶	0,9809
Flores frescas OAHD	0,3662	1,1467	2,731	8,719 ⁻⁰⁴	1,200 ⁻⁰⁴	0,9807
Flores secas OAHD	0,263	1,7167	3,802	5,826 ⁻⁰⁴	4,02978 ⁻⁰⁵	0,978

Tabla 13

Comparación resultados Cs y K calculados versus datos experimentales de la cinética de extracción del aceite esencial de calendula officinalis L.

Método de extracción	Estado de la flor	% rendimiento (v/w) exp.	Cs rendimiento (v/w)	Velocidad de acumulación aceite (ml/min) Exp	K (Velocidad de acumulación aceite (ml/min))
HD	Ff	0,8251 ^b	0,8419 ^b	0,0200 ^b	0,0266 ^b
	Fs	0,5614 ^b	0,6604 ^b	0,0069 ^b	0,0059 ^b
OAHD	Ff	1,2499 ^a	1,5164 ^a	0,0887 ^a	0,0627 ^a
	Fs	1,2847 ^a	0,9130 ^a	0,0293 ^a	0,0134 ^a

^a indica que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de 0.05, según Teste de Tukey.

^b indica que no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de 0.05, según Teste de Tukey.

6.5 Caracterización preliminar del aceite esencial de *calendula officinalis L.*

Los resultados obtenidos de la caracterización preliminar del aceite esencial de *calendula officinalis L.*, se presentan en la tabla 14; en el Anexo 16 se presentan los datos según número de réplicas, en el Anexo 17 se presenta el resultado de las medidas de tendencia central.

Tabla 14

Caracterización preliminar del aceite esencial de caléndula officinalis L

	HDFf	HDFs	OAHDf	OAHDs
Color	Amarillo claro	Amarillo oscuro	Amarillo claro	Amarillo oscuro
Olor	Característico a la planta			
Apariencia	Líquida- viscosa			

	Índice de acidez (mg. KOH/g)		Densidad (g/mL)		Índice de refracción (20°C)	
	Ff	Fs	Ff	Fs	Ff	Fs
Hidrodestilación (HD)	0,6857 ^a (0,0624)	0,6889 ^a (0,0636)	0,8859 ^a (0,0003)	0,8865 ^a (0,0001)	1,4893 ^a (0,0003)	1,3883 ^a (0,0045)
Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (OAHD)	0,8330 ^a (0,0001)	0,8530 ^a (0,0010)	0,8891 ^a (0,0002)	0,8878 ^a (0,0002)	1,3807 ^a (0,0003)	1,3927 ^a (0,0021)

^a media aritmética de los datos . Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar (n=3)

Contenido de fenoles totales del aceite esencial de *caléndula officinalis L*: Los resultados obtenidos en la determinación de fenoles totales (µg/mL) del aceite esencial de *caléndula officinalis L*. obtenido mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación (OAHD), se presentan en la tabla 15. Los resultados fueron procesados mediante la ecuación (5), obtenida por regresión lineal a partir de los datos de la curva patrón empleando como estándar diferentes soluciones de ácido tánico (50 mg/L).

$$y = mx + b$$

$$y = 0,0113x - 0,0038$$

$$R^2 = 0,9915$$

Ecuación (5)

En el Anexo 18 se presenta la curva patrón obtenida para conocer la concentración total de fenoles. En el anexo 19 se puede revisar el estadístico completo en donde se detalla la

media aritmetica , la ANOVA y el test de Tukey para un intervalo de confianza del 95% y un valor de alfa ($\alpha=0.05$).

Tabla 15

Contenido total de fenoles ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de calendula officinalis L.

	Muestra	Concentración fenoles ($\mu\text{g/mL}$)
Hidrodestilación HD	Aceite Ff	25,25 ^{a, c}
	Aceite Fs	59,98 ^{b, c}
Calentamiento óhmico OAHD	Aceite Ff	28,60 ^{a, d}
	Aceite Fs	60,02 ^{b, d}

^{a-b} indica que no hay diferencias significativas $p \geq 0,05$, ($n=3$) según estado de la flor.

^{c-d} indica que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de 0.05 según interacción estado de la flor -método de extracción. Test de Tukey: con $\alpha=0.05$ y $f=8$ grados de libertad para el error. $q=(3,8)=4.53$. $T=14.56$.

6.6 Requerimiento energético para la extracción de aceites esenciales mediante hidrodestilación (HD) y calentamiento óhmico asistido mediante hidrodestilación (OAHD)

Se determinaron los requerimientos energéticos para llevar a cabo cada proceso de extracción, los resultados se presentan en la tabla 16 y tabla 17.

Tabla 16

Energía requerida para el incremento de la temperatura

	Energía requerida		
	W (j/s)	Tiempo (seg)	Energía j
HD Ff	1200	1140	1,37 ⁰⁶
HD Fs	1200	1020	1,22 ⁰⁶
OAHD Ff	352	300	1,06 ⁰⁵
OAHD Fs	440	120	5,28 ⁰⁴

Tabla 17

Consumo energético de los métodos de extracción en Kw/h

Consumo de energía Kw/h				
	Kw	tiempo (horas)	Kw/h	Kw/h 1ml
HD Ff	1,20	0,75	0,9	1,091
HD Fs	1,20	1,63	1,96	3,491
OAHD Ff	0,35	0,25	0,088	0,070
OAHD Fs	0,44	0,75	0,33	0,257

7. ANALISIS DE RESULTADOS

7.1 Caracterización de la materia prima.

De acuerdo a los resultados que se exponen en las tabla 9 y 10, se presenta el análisis por parámetro independiente:

7.1.1 Humedad

De acuerdo a los objetivos de la investigación la etapa inicial relaciona la caracterización de la materia prima para determinar algunos parámetros químicos y físicos que pueden aportar el ajuste del diseño de experimentos en la etapa de extracción y caracterización preliminar del aceite. De acuerdo a los resultados obtenidos (tabla 9, el anexo 7) se puede indicar que el contenido de humedad en base húmeda (% H bh) de flores de *calendula officinalis L.*, los datos registran un comportamiento altamente homogéneo (CV=0.47%); el promedio obtenido es confiable y representativo para decir que el porcentaje de humedad de las flores frescas de *calendula officinalis L* es del 86.25% en las condiciones de siembra descritas en el capítulo de metodología, este valor experimental se acerca al reportado en su momento por Berti, 2003 (80-84%) y por Agudelo, (2011) en donde se obtuvo una humedad de 89.2%; en otras investigaciones para muestras florales de la familia botánica (Asteraceae), Vidal (2012), reporta el 67.57%. Los resultados promedio para el porcentaje de humedad en base seca (% H bs) de flores de *calendula officinalis L.*, fue de 28.86%, registrando una mayor dispersión frente a los datos de (% H bh); sin embargo se puede inferir que dicho promedio es representativo (CV=3.89). De acuerdo a la media de los datos, las muestras tras someterlas a un proceso de deshidratación a las condiciones establecidas retienen un alto contenido de agua, relacionando que las muestras tiene una alta afinidad para ligar moléculas agua, esto dado probablemente a la composición química de las flores *calendula officinalis L.*; por lo tanto sería de interés conocer la composición en compuestos polares que hacen parte de la estructura celular de este

tipo de flores. La deducción anterior relaciona que se debe dar más tiempo de secado o considerar otro método como por ejemplo en estufa al vacío. La humedad en base seca ha registrado valores del 14% (Lastra & Piquet., 1999), entre del 10.7% y 10.8%, (Dominguez., 2012), y de 10.05 y 11.45 (Sánchez, Rivera & Carballo., 2010); se puede llegar a obtener un valor del 7.62% para muestras florales de la familia botánica (Asteraceae), Vidal, (2012). Al retirar toda el agua posible (% H bh), se puede conocer el contenido de materia seca, que en promedio registro 14.98%, valor que resulta de relevante utilidad en la extracción del aceite esencial *calendula officinalis* L., para determinar el contenido de aceite obtenido por gramo de muestra. El promedio de los datos es representativo y confiable y se puede decir que el residuo seco es de 14.98 g/100g de flor fresca (CV=3.45), valor muy cercano al reportado por Agudelo, (2011) de 10.8. Dado al alto valor del porcentaje de humedad de las muestras, el peso seco es bajo en comparación al reportado en otros estudios, por ejemplo en Vidal (2012) para muestras florales de la familia botánica (Asteraceae), está alrededor de 32.42%.

7.1.2 Cenizas

Hace parte de la caracterización preliminar de la materia prima, de acuerdo a los datos obtenidos se puede conocer la composición de sustancias minerales que posee la planta. La caléndula tiene minerales que depende de la forma del cultivo, la tierra en que se siembra, los abonos utilizados (químicos u orgánicos), riego y forma de cosecha, pero en general los minerales que se encuentran en las flores son el nitrógeno y potasio; otros que se encuentran en diferentes partes de la planta son magnesio, cobre, Zinc, hierro, cobre, plomo, níquel. Los resultados obtenidos en la práctica fueron para cenizas totales 10.142%, Cenizas insolubles en agua 25.028%, Cenizas solubles en HCl 1.410%. El promedio para los datos de cenizas totales es representativo y homogéneos (CV= 4.48); este valor es similar al reportado por Acosta de la Luz, *et al.*, 2001 y Lastra & Piquet (1999), donde exponen que el valor de cenizas totales debe ser de máximo o menor al 11%; valores inferiores se obtuvieron en Sánchez, Rivera & Carballo (2010), cuando aplicaron diferentes biofertilizantes a la planta de caléndula, oscilando entre 8.40% y 9.39%.

El promedio para los datos de cenizas insolubles en agua y en ácido son menos homogéneos (CV= 36.16, CV= 33.33), pero al revisar la literatura se observa que la cantidad de cenizas insolubles en agua guarda relación con los reportados en varias publicaciones, como por ejemplo un 35% ó entre 29.07 % 37.89 (Acosta de la Luz, *et al.*, 2001; Sánchez, Rivera &

Carballo., 2010). Durante la revisión de la literatura, no se encontraron datos que reporten contenido de cenizas insolubles en ácido, pero se puede indicar que en las flores *calendula officinalis* L. el contenido de sales de sílice o de minerales que se encuentran en forma de quelatos es bajo.

7.1.3 Porcentaje de grasa

Durante esta determinación se calcula el contenido total de grasa bruta que se tenga en la muestra, por lo tanto el resultado es un estimativo del contenido de ésteres de los ácidos grasos, fosfolípidos, lecitinas, esteroides, ceras, ácidos grasos libres que se encuentre en la flor fresca de *calendula officinalis* L. El coeficiente de variación (CV 29.78), reporta que los datos no son homogéneos para indicar que las muestras de la flor en fresco de *calendula officinalis* L. tiene un porcentaje de grasa total de 10.41% , sin embargo la revisión de la literatura relaciona valores cercanos y/o similares por ejemplo, Yanar, Y. *et al.* (2007), determino un porcentaje de grasa cruda del 9.35%, valor que más se aproxima al valor obtenido en el laboratorio. En los reportes de Muley., *et al.* (2009), describe un contenido de 17.2% para el extracto étereo, en donde el 15.7% le corresponde a lípidos neutros (acilglicéridos), el 0.6% a fosfolípidos y el 0.9 a glucolípidos. En la publicación de Miguel., (2015) indica que las muestras vegetales pueden tener un 5,5% en donde el 76% corresponde de ácidos grasos saturados (ácido palmítico, C16: 0.36 %) y el ácido mirístico - C14: 0.25 %). De acuerdo con Qiu, X., *et al.* (2001) las flores de *calendula officinalis* L., pueden acumular más del 40% de ácidos neutrales como Caléndico (C18:3- ácido 8E,10E,12Z-octadecatrienoico), ácido graso funcional que contiene enlaces dobles conjugados.

7.1.4 pH

La concentración de iones de hidrógeno presentes en la muestra [H⁺] es la cuantificación de los ácidos orgánicos (ácidos carboxílicos) que contiene en estado fresco las flores de *calendula officinalis* L., en este sentido, puede abarcar ácidos como el óxalico, succínico, cítrico, málico, esteárico y ácido ascórbico, pero también se cuantifica ácidos grasos libres,

(Moreno, *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos, indican que el promedio de los datos para un pH de 5.48 es altamente homogéneo (CV 0.81) para indicar que las flores de *calendula officinalis* L., en la condiciones de la experimentación registra esta cantidad de iones de hidrógeno, valor que concuerda con Acosta., (2006), en donde el pH del extracto acuoso de la *caléndula officinalis* L. fue de 5,4 y se relaciona con la determinación de ácido cítrico que se encuentra en gran proporción en la planta, según Miguel, (2015).

7.1.5 Marcha fitoquímica

De acuerdo con Domínguez, (2012), realizar un ensayo fotoquímico preliminar proporciona información cualitativa de la posible presencia de metabolitos como; fenoles, taninos, quinonas, carotenoides y cumarinas, sustancias relacionada con la composición química del aceite esencial de *calendula officinalis* L., y que pueden presentar actividad biológica relacionada con efectos de antioxidante.

Los resultados que se exponen en la tabla 10, para los extractos de las flores frescas y las flores secas, indican que independiente del estado de la flor hay presencia de compuestos químicos que se relacionan con taninos, leucoantocianidas y quinonas. En ninguno de los estados de la flor de *calendula officinalis* L., se registró presencia de flavonoides y el contenido descriptivo para fenoles es incierto, dado que la prueba de Acetato de plomo fue positiva, pero la prueba confirmatoria de gelatina – sal fue negativa. En la formulación de futuras investigaciones en donde se relacione la evaluación de la capacidad antioxidante del aceite esencial de flores de *caléndula officinalis* L., se debe hacer un ensayo fotoquímico más completo para proporcionar mayor información para la composición química preliminar del aceite esencial.

7.2 CINETICA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

7.2.1 Incremento de la temperatura hasta punto de ebullición y Velocidad de incremento de la temperatura (°C/min)

El incremento de la temperatura hasta ebullición (95°C en Duitama) es el primer parámetro cinético a medir; registra el aumento de la temperatura en grados centígrados por unidad de tiempo hasta llegar a la temperatura de ebullición del solvente, que para el caso de las extracciones acuosas esta entre 90- 100°C. A partir de los valores de tiempo como variable independiente, se grafica el aumento de la temperatura (figura 26), cuya pendiente genera la tasa o velocidad del incremento de la temperatura en °C por minuto (°C/min). Los perfiles de temperatura durante la HD y OAHD con flores frescas y secas de *calendula officinalis* L. se presentan en la figura 26. Para llegar a la temperatura de ebullición en HD independiente del estado de la flor se requiere de 19 a 20 min. (CV 6.24 y 4.08 respectivamente), mientras que para OAHD es necesario 5 a 2 (CV de 15.71 y 23.57 respectivamente) (tabla 11).

Según estudios hechos por (Gavahian, et al., 2012 y Gavahian, M., et al., 2015) el incremento de la temperatura reportado para OAHD fue de 5.83 °C/min y 6.10°C/min, valores cercanos a los obtenidos en el laboratorio (OAHDff 5°C/min y OAHDfs 2°C/min, (tabla 11 y figura 26), para el caso de la HD reportan tiempos de incremento de la temperatura de 27.79 °C/min y 34.16 °C/min respectivamente; en la experimentación se obtuvieron menores tiempos (19°C/min para HDff y 20°C/min para HDfs, figura 26, tabla 11), indicando que en las condiciones de la experimentación se obtuvieron mejores resultados para HD y OAHD en relación a los que se encuentran publicados. También se han encontrado valores de tiempos de incremento de la temperatura superiores a 6 min para OAHD como los que reporta Damyeh & Niakousari., 2016, de 21.51 °C/min, y, para HD de 35.75 °C/min; aun así así es evidente que el OAHD representa una ventaja con respecto a la HD en cuanto al tiempo que requiere para llegar a la temperatura de ebullición.

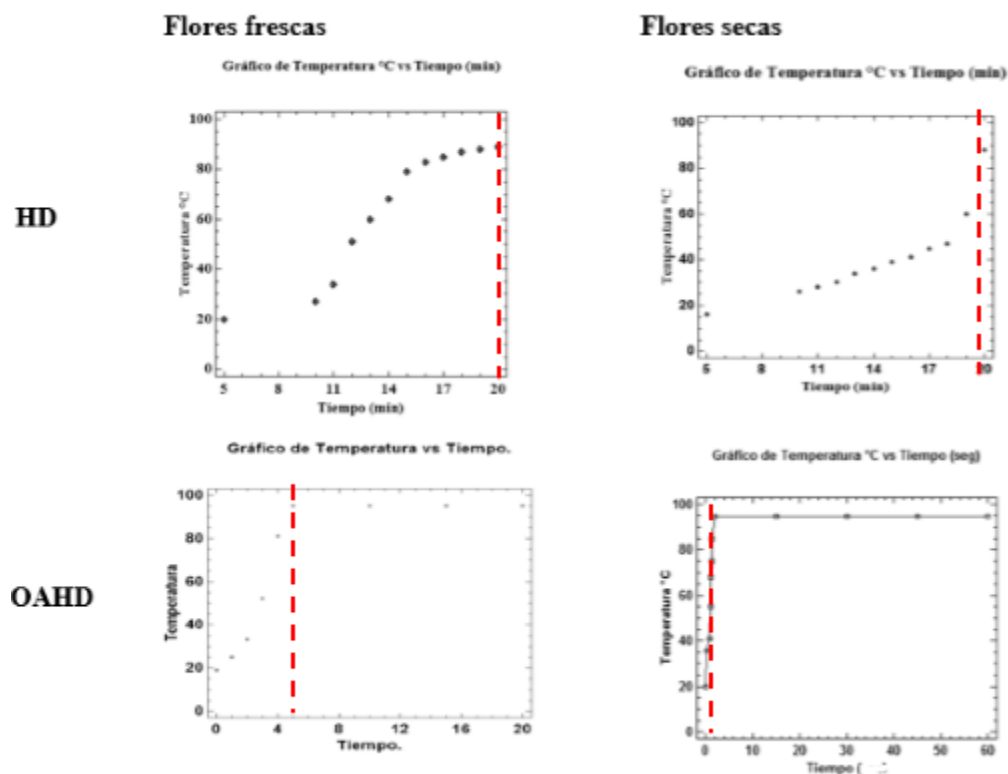


Figura 26. Incremento de la temperatura hasta ebullición por diferentes métodos de extracción

El análisis de varianza ANOVA para la velocidad de incremento de la temperatura a un valor de $p \leq 0,05$; indica que hay diferencias significativas entre el estado de la flor, los métodos de extracción y la interacción entre el estado de la flor y el método de extracción; la verdadera significancia se encontró, de acuerdo a la prueba de Tukey ($T \geq 2.6078$), que el método de extracción OAHD tiene un alto efecto en el incremento de la temperatura y está aún más marcado con respecto al estado de la flor; este comportamiento se analiza en los perfiles de temperatura versus tiempo que se muestran en la (figura 26). El proceso de deshidratación aplicado a las flores, registra el valor más alto ($38 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), incluso duplicando al obtenido en flor fresca en el mismo método ($16.2 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). De acuerdo a los resultados obtenidos, en el OAHD se obtienen mejores resultados debido a la forma de transmisión de calor en el sistema: la corriente eléctrica (generalmente alterna) es transmitida directamente sobre las flores de *calendula officinalis* L. generando calor a una velocidad mayor que cuando se hace en un proceso por conducción convencional como sería el caso de HD aplicada, adicional a lo anterior, el análisis debe enfocarse en explicar por qué en el OAHD se logra un mayor

incremento de la temperatura en el estado de la flor de *calendula officinalis* L seca que en estado fresco; se puede deducir que el proceso de deshidratación de las flores puede favorecer el aumento de la conductividad eléctrica requerida para el proceso de calentamiento, pero esto se debe verificar en futuras propuestas de investigación; lo que sí se puede inferir es que en el proceso de deshidratación de la flores de *calendula officinalis* L. se retira el contenido del agua libre, quedando expuestos grupos polares y apolares que pueden hacer parte de las membranas celulares, incluso de las vacuolas donde se encuentra el aceite esencial; esto puede favorecer procesos de electroporación que tengan lugar a una mayor velocidad de los que se puedan presentar en la flor fresca, facilitando de esta forma una mayor permeabilización y desestabilización de la capa lipídica y proteínas de membrana tal como lo expone Fernández, *et al*, (2001) y que posteriormente lo explicó Blumrosen, *et al*, (2016); esta electroporación finalmente provoca el hinchamiento y ruptura de la membrana celular de la planta, aumentando la difusividad en la extracción del aceite esencial y el incremento de la temperatura en el interior del material vegetal, eventos que son favorecidos si existe una alta conductividad térmica en la muestra, hecho que se favorece con la adición de una solución salina del 1% a las flores de *calendula officinalis* L. La conductividad eléctrica juega un papel importante, debido a que la matriz vegetal posee una baja conductividad eléctrica, es necesario proporcionarle desde el medio acuoso la carga eléctrica necesaria para favorecer reacciones de electroporación (movilización iónica y de dipolos), tal como lo exponen Darvishi, *et al*. (2013); Sakr & Liu, (2014) y Sarkis, *et al*. (2013), de ahí el requerimiento de emplear soluciones salinas en concentraciones que van del 0,3 al 1% (Damyeh & Niakousari., 2016; Gavahian, *et al.*, 2012; y Gavahian, M., *et al.*, 2015). Dentro de esta argumentación es importante indicar que la solución salina empleada tiene un efecto marcado sobre la conductividad en el OAHD y que ha registrado diferencias no significativas cuando se ha empleado en procesos de HD, Gavahian, *et al*. (2012). Las altas velocidades obtenidas en los procesos de extracción de aceite esencial de *calendula officinalis* L obtenido mediante OAHD específicamente en flores secas, también dependen de la forma como se lleve a cabo los fenómenos de transferencia de calor; en un proceso convencional de extracción como el que se llevó a cabo en HD sobre flores de *calendula officinalis* L, la transmisión de calor se produce siempre través de un gradiente térmico mediante conducción y convección, mientras que en el OAHD se considera sólo un bajo gradiente de temperatura por convección mas no el de conducción (Damyeh & Niakousari, 2016). El calor se genera en el

interior del material vegetal a una velocidad más alta y de forma homogénea, generando una alta velocidad de calentamiento en el sistema, lo que representa una ventaja significativa sobre los métodos que requieren calefacción convencional, esto establece la diferencia de la forma como se lleva a cabo la transferencia de calor en HD, de ahí que éste método de extracción registre bajas velocidades de incremento de la temperatura por unidad de tiempo tanto en flores en estado fresco como en estado seco (5.7 °C/min, 3.8 °C/min) respectivamente, donde los gradientes por conducción y convección son altos y la transferencia de calor sucede desde el exterior hasta el interior del aceite esencial, mientras que en el OAHD a pesar que sucede en la misma dirección se da del exterior a la superficie de las glándulas y por el efecto de electroporación la transferencia de calor se hace rodeando el compartimento celular.

De acuerdo a la revisión de la literatura no se encontraron referentes bibliográficas en cuanto a velocidad de incremento de la temperatura de flores de caléndula ni de la misma familia botánica a la que pertenece (Asteraceas); se encontró también un bajo número de artículos que relacionan el impacto del OAHD versus el método convencional HD para aceites esenciales de otras especies, pero estos permiten para el parámetro que se analiza, comparar el aumento de la temperatura por unidad de tiempo. De acuerdo a los resultados obtenidos al usar flores frescas de *calendula officinalis* L por HD se obtuvo un incremento de 5.7 °C/min, y en flores secas de 3.8 °C/min, valores cercanos a los reportados por Gavahian, *et al.*(2012) y Gavahian, *et al.* (2015) al obtener una velocidad de incremento de la temperatura por HD de 3.0°C/min y 2,8°C/min respectivamente del aceite esencial de las partes aéreas de Tomillo con una humedad de 11% y de la Menta con una humedad del 12%; estos mismos autores relacionan para OAHD una velocidad de incremento de la temperatura en función del tiempo de 18°C/min, y de 15.7°C/min respectivamente, valores muy cercanos al que se obtuvo al trabajar con flores frescas con una humedad del 86.25% en el método de OAHD pero valores inferiores a los obtenidos en la experimentación en flores secas (38 °C/min) con una humedad de 28,86 % por OADH. Se concluye que el porcentaje de humedad presente en la matriz vegetal condiciona este parámetro cinético, y que se debe efectuar más estudios para verificar el efecto combinado que presenta los métodos de extracción y el porcentaje de humedad en la muestras frente a este parámetro; con lo que sí se concuerda con los autores expuestos es en que se llega a aumentar entre 6 a 10 veces la velocidad de incremento de temperatura en el OAHD frente al HD.

7.2.2 Rendimiento (bs %v/w), tiempo acumulación aceite (min), tiempo total de extracción (min), duración de extracción (min) y velocidad de acumulación del aceite (mL/min).

Los resultados de la cinética de extracción del aceite esencial obtenido de la flor de *Calendula officinalis* L, en estado fresco y seco, mediante HD y OAHD se presentan en la tabla 11 y figura 27; abarca los siguientes parámetros: rendimiento (bs %v/w), tiempo acumulación aceite (min), tiempo total de extracción (min), duración de extracción (min) y velocidad de acumulación del aceite (mL/min). La revisión bibliográfica que explican los parámetros cinéticos son escasos para investigaciones relacionadas con el aceite esencial de calendula officinalis L y en general para otras especies de hierbas aromáticas; en la revisión de las bases de datos (ScienceDirect, Academic Collection, ebooks y proquest) es bajo el número de artículos publicados por lo tanto limitan la comparación de resultados obtenidos.

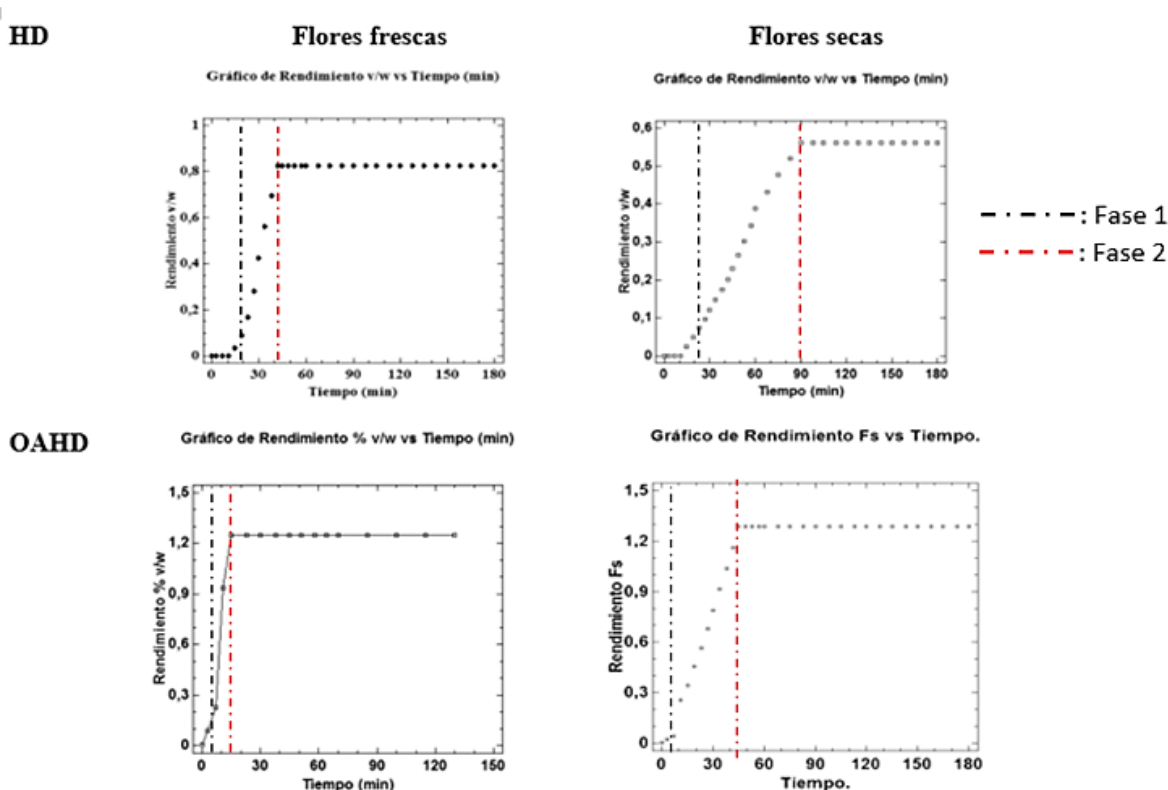


Figura 27. Rendimiento de extracción por diferentes métodos de extracción. (HD)(OAHD) en función del tiempo de extracción.

El tiempo de acumulación de aceite (tiempo que se empieza a contabilizar desde que empiezan a caer las primeras gotas de aceite esencial sobre el recolector de la trampa d Clevenger) está en función del parámetro cinético incremento de la temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Dependiendo de método de extracción se pueden obtener tiempos cortos que pueden ir desde 5 minutos hasta 30 minutos, esto depende de la forma como se realice la transferencia de calor y de masa al material vegetal para alcanzar el equilibrio térmico; en los resultados de la experimentación se puede observar que el inicio de la acumulación de aceite después que el sistema llega a la temperatura de ebullición, es más rápido por el método de OAHD en flores frescas y secas (6 min, 2 min respectivamente), que por el método de HD para los mismos estados de la flor (20 min). Según la revisión bibliográfica, autores como Gavahian, M., *et al.* (2012) registraron tiempos para el OAHD e HD de 5.83 min y 27.79 min; en una investigación posterior Gavahian, M., *et al.* (2015) reportó tiempos de 6.17 min y 33 min respectivamente; valores que concuerdan con los obtenidos para el OAHD cuando se emplearon flores de *calendula officinalis* L en estado fresco (6 min) pero no cuando se emplearon flores de *calendula officinalis* L en estado seco (2 min). En cuanto a los valores obtenidos en el tiempo de acumulación del aceite por HD en flores frescas y secas de *calendula officinalis* L, en la experimentación se registraron menores tiempos de los que se indican en las anteriores publicaciones y en la que hace Damyeh, *et al.*, (2016), que reportó un tiempo de 39 min. Los cortos tiempos registrados por OAHD vienen en función del incremento de la temperatura de ebullición, esto se da por los fenómenos de transporte y eventos no térmicos (electroporación) que se dan con mayor intensidad en el estado de la flor seca que fresca; en la HD en cualquiera de los estados de la flor, los tiempos son mayores debido a los gradientes de conducción y convección que se presentan en el proceso.

A partir de los datos de rendimiento (%v/w), se pueden establecer los parámetros cinéticos que relacionan el tiempo total de extracción (tiempo necesario para obtener el máximo rendimiento de aceite esencial), duración de la extracción (diferencia entre el tiempo total de la extracción y tiempo de acumulación del aceite) y velocidad de acumulación del aceite (ml/min). Dependiendo de la técnica de extracción y por ende de la velocidad de incremento de la temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$), se llega en un menor tiempo a la temperatura de ebullición, lo que condiciona bajos tiempos de extracción (tiempo total de extracción (min) y duración de la extracción (min)). Los resultados para el OAHD cumplen la premisa anterior ya que registran menores tiempos de extracción total en flores frescas y secas de *calendula officinalis* L. (15 y 45 min)

respectivamente, frente a la HD en los mismos estados de la flor (42 y 90 min). Este mismo análisis se hace extensivo para la duración de la extracción; en el OAHD en flores frescas fue de 9 min reduciéndose en un 60% el obtenido por HD (22 min), en flores secas por OAHD, de 43 min se reduce un 39% con respecto al tiempo obtenido HD (70 min); resultados que se confirman en análisis de varianza, ANOVA, en donde se establece diferencias significativas entre todos los resultados; la comparación de medias indica que los tiempos totales en que se efectúa la extracción del aceite esencial son diferentes con respecto al estado de la flor y al método de extracción empleado. Al comparar los resultados experimentales con los encontrados en la literatura, el tiempo total de extracción y duración de la extracción para flores frescas por el OAHD y HD son menores que los reportados por Gavahian, M., *et al.* (2012); Gavahian, M., *et al.* (2015) y Damyeh & Niakousari (2016), mientras que el registro del tiempo total y la duración de la extracción en flores secas por OAHD y HD fueron superiores a los reportados en la literatura (Gavahian, M, *et al.*, 2012 y Gavahian, M. *et al.*, 2015), pero se ubican dentro del rango promedio del reportado por Damyeh & Niakousari (2016).

En el análisis referente al rendimiento: este parámetro relaciona la máxima cantidad de aceite que se puede obtener a partir de la materia seca de las flores de *calendula officinalis* L, en estado fresco y seco. Los resultados son reportados en la tabla 12 y en la figura 27 en donde se observa diferencias significativas en todos los tratamientos ($p \leq 0.05$), por lo que se puede llegar a afirmar que tanto el estado de la flor como el método de extracción influyen en la cantidad de aceite obtenido. Los mayores rendimientos se registran en flores frescas de *caléndula officinalis* L por el método HD (0.8251 %v/w) y en OAHD (1.2499 %v/w). A la luz de los resultados obtenidos se hace necesario entrar a analizar el por qué el estado de la flor en estado fresco en HD y OAHD registra los mejores resultados, cuando se hubiese esperado que el mayor rendimiento, específicamente en el método OAHD, estuviera relacionado con el estado de la flor en seco, dado que registra la mayor velocidad de incremento de la temperatura y el menor tiempo de acumulación del aceite. Es relevante para el análisis relacionar los valores de rendimiento versus el tiempo total de la extracción y es allí donde podemos inferir que los máximos rendimientos dentro de la extracción por HD, las flores frescas registra un rendimiento de 0.8251 %v/w en 42 min, frente 0.5614 %v/w en 90 minutos en flor seca, resultados que concuerdan y están similares a los reportados por Salome, *et al.*, (2015); Abdullabekova, *et al.*, (2014) y Tosun *et al.* (2011); en el OAHD el estado de la flor en fresco registra 1.2499 %v/w en 15 min, frente a

1.2847 %v/w en 45 min, resultados que guardan una relación muy próxima a los reportados por Gavahian, M., *et al.* (2012); Gavahian, M., *et al.* (2015) y Damyeh & Niakousari (2016). A pesar que el máximo rendimiento en el OAHD se registra en las flores secas, el resultado es condicionado por el tiempo total de extracción (45 min); esto relaciona que aún después de 15 minutos de extracción, aún hay cantidad de aceite por extraer en la vacuola vegetal, este evento se puede atribuir a dos sucesos que se pueden presentar en el equipo del OAHD: 1) efecto de apelmazamiento; esto puede afectar la velocidad de la transferencia eléctrica por ende del calentamiento, es así que los eventos térmicos y no térmicos no se pueden dar a la misma velocidad que se registran en el estado de la flor fresca; para futuras investigaciones en el área y en el tema, es importante evaluar el efecto de apelmazamiento que registra las flores secas *calendula officinalis* L. y su efecto sobre la homogeneidad de la distribución de la conductividad y temperatura en diferentes partes del equipo de OAHD. 2). La formación y acumulación de una capa de óxido que se forma en la superficie de los electrodos que tiene contacto con la muestra, como consecuencia de reacciones electroquímicas entre la solución salina de NaCl (1%) y el material de los electrodos (acero inoxidable); esto ocasiona variabilidad en la intensidad de la conductividad eléctrica sobre el material vegetal. Al dejar el estado de la flor constante y variar el método de extracción se reportan diferencias significativas, adicional, el análisis estadístico también conduce a indicar que se presenta un efecto combinado entre el estado de la flor y el método de extracción ($T \geq 0.00178$), en donde los mejores resultados están en el método OAHD, indicando en esta investigación que es un método de extracción superior en relación con el método convencional HD.

La relación rendimiento versus tiempo conduce al análisis de la cinética de extracción. Una representación gráfica de los valores correspondientes, conlleva a obtener la relación rendimiento versus tiempo como las que exponen Périno, *et al.* (2013), Filly, (2014), Gavahian, M., *et al.* (2015), Boukroufa, *et al.* (2015); para los resultados experimentales se exponen en la figura 27, en donde se pueden identificar las fases del proceso de extracción así: Fase 1, corresponde a la cantidad de aceite que se acumula en un tiempo específico, (Armijo, *et al.*, 2012, Filly, (2014); Boukroufa, *et al.*, (2015) y Kusuma & Mahfud., 2016), que para la experimentación es igual tiempo inicial de acumulación del aceite. El comportamiento de la figura 27, relaciona que la menor magnitud de esta fase corresponde al tratamiento OAHD, siendo más marcada para el estado de la flor seca. Esta fase se caracteriza por desarrollarse de

una forma rápida, ya que las primeras gotas que se encuentran en la superficie de la vacuola del material vegetal migran y se disuelven rápidamente en el flujo de vapor que circunda la matriz vegetal, esto sucede por la sinergia que existe entre los fenómenos de transporte masa y calor específicamente en el OAHD dado que dichos fenómenos de transporte se realizan en una sola dirección. En la figura 27 se puede observar que esta fase para el método de HD en flores frescas y secas, se lleva a cabo a un tiempo mayor, existiendo una prolongación, dado que las transferencias de masa y calor se realizan en sentido contrario, esto, por la existencia de gradientes de convección y conducción. Fase 2, corresponde a una difusión interna del aceite esencial hacía el medio exterior dado por el calentamiento interno sobre el medio acuoso que rodea a las vacuolas o compartimiento celulares en donde se almacena el aceite (Boukroufa, *et al.* 2015), en los argumentos de Armijo, *et al* 2012, relaciona que esta fase es dominada por procesos de transferencia de masa hacia el vapor desde el interior de la matriz que contiene el aceite esencial. Esta fase tiene su inicio después del tiempo de acumulación de aceite y finaliza cuando se obtiene el máximo rendimiento. Dependiendo del método de extracción, esta fase se puede realizar en menos tiempo para obtener una mayor cantidad de aceite, tal como se observa en la figura 27 por el método OAHD, donde para un tiempo total de 15 min se obtuvo un rendimiento de aceite de 1.2499 %v/w en flores frescas y un tiempo de 45 min con un rendimiento de 1.2847 %v/w en flores secas; estos resultados evidencian una mayor capacidad de difusión molecular del aceite que migra del interior al exterior como resultado del efecto combinado de los fenómenos de transporte de masa y calor que suceden en la misma dirección, mientras que para el método de HD es mayor la amplitud de la fase debido a la forma como se transmite el calor y a los gradientes de convección y conducción que se dan en el proceso. Sobre el comportamiento gráfico se puede observar la última, fase 3, que representa el final de la extracción de los aceites de la matriz vegetal, la cual es independiente del tiempo de extracción.

La relación de la pendiente de la gráfica, $\frac{\Delta \% \text{Rendimiento}}{\Delta t}$, determina el parámetro cinético velocidad de acumulación de aceite esencial (ml/min), la cual se determinó a partir de la pendiente de los datos obtenidos de rendimiento en %v/w, frente al tiempo de extracción (min). Los resultados de la tabla 11, reportan significancia estadística entre los métodos de extracción y estados de la flor ($p \leq 0.05$; $T \geq 7.18^{-5}$). Al dejar constante el estado de la flor, se

observa un incremento de aproximadamente 4 veces en la velocidad de acumulación del aceite por el método de OAHD frente a HD. Al dejar constante el método de extracción se analiza la significancia entre los resultados; se evidencia el efecto del método de extracción sobre la cantidad de aceite esencial que se obtiene por unidad de tiempo, registrando los mejores resultados para el método OAHD (0.0887 ml/min y 0.0293 ml/min) frente al método de HD (0.0200 ml/min y 0.0069 ml/min) para el estado de la flor fresco y seco respectivamente. En la revisión de la literatura los resultados obtenidos por OAHD y HD son similares y están en los rangos promedios a los reportados por Gavahian, M., *et al.* (2012); Gavahian, M., *et al.* (2015) y Damyeh & Niakousari (2016).

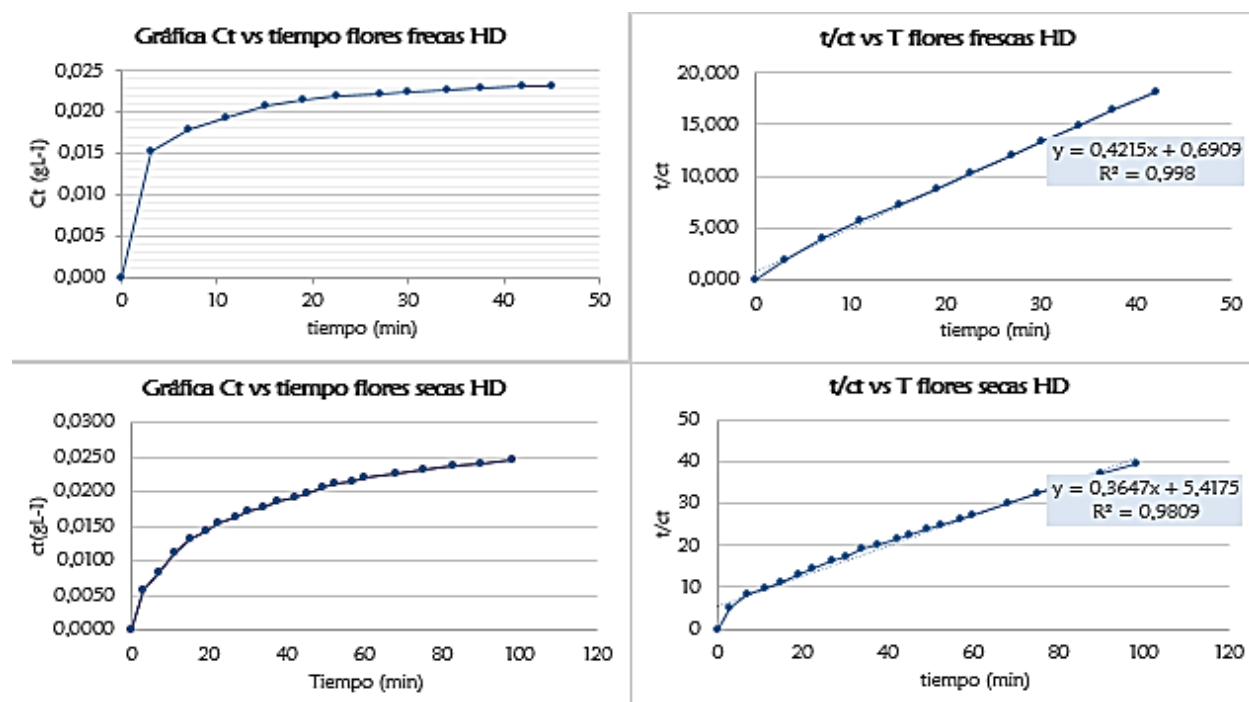
7.3 MODELAMIENTO CINETICA DE EXTRACCIÓN

El modelamiento de la cinética de extracción fue basado en un modelo cinético de segundo orden, con el fin de predecir y comparar las interacciones entre la variable independiente (tiempo) y las variables de respuesta obtenidas experimentalmente (parámetros cinéticos); el método matemático permite determinar la concentración máxima de aceite (C_s), la velocidad inicial de extracción (h), concentración de aceite esencial en cualquier momento (C_t) y la constante de extracción de segundo orden (k). Los parámetros cinéticos estimados en el modelamiento de la cinética de extracción se muestran en la tabla 12.

En la figura 28-gráficas lado izquierdo se observa para cada método de extracción y estado de la flor, la velocidad de extracción incrementa al igual que lo hace el tiempo de extracción, gráficas que siguen el comportamiento descrito por Kusuma & Mahfud (2016) y Man, *et al.*, (2012) y a las obtenidas a nivel experimental. Las gráficas del modelamiento $ct/$ tiempo (min) permiten identificar de una forma más clara que a medida que avanza el proceso de extracción se va agotando la cantidad de aceite extraído que se genera por unidad de tiempo, disminuyendo también la velocidad de acumulación de aceite, llegando hasta un máximo donde se manifiesta en forma de asintótica en cada una de las gráficas. Para el método de HD como en OAHD en flores frescas y secas, las gráficas proporciona información para determinar: la cantidad media de aceite en g/L que se pueden llegar a obtener en los primeros minutos del proceso (tiempo inicial de acumulación) como también la máxima cantidad de aceite g/L que se puede obtener (tiempo

final de la extracción) al finalizar la extracción del aceite esencial de flores de *calendula officinalis* L. Un complemento al análisis se relaciona al identificar en cada una de las curvas las fases implicadas en el proceso de extracción, de acuerdo con (Kusuma & Mahfud, 2016) en la primera fase “hay una fuerza impulsora entre el disolvente fresco en la cual se extrae la mayor parte del aceite esencial contenido en la flor a una rápida velocidad; a continuación se presenta la 2 fase la cual es mucho más lenta que se produce con la difusión externa de aceite esencial en el extracto. Estos fenómenos son típicos de un proceso de segundo orden y pueden ser interpretados en el análisis de los resultados experimentales mediante el trazado de t / c_t en función del tiempo”.

En la figura 28 (gráficas lado derecho), se observa la Linealización de los datos para obtener la ecuación de la recta y a partir de esta calcular los valores de coeficiente de determinación (R^2), máxima cantidad de aceite (C_s), y velocidad inicial de extracción (h) y constante de velocidad de acumulación de aceite esencial de *calendula officinalis* L (k). El coeficiente de correlación R^2 , para cada uno de los tratamientos y estados de la flor usados (fresca y seca), indican que los resultados del modelo representan una alta confiabilidad para replicar los resultados, en el anexo 13 se presentan los resultados estadísticos del modelamiento y en el anexo 14 se presentan los resultados obtenidos del modelamiento.



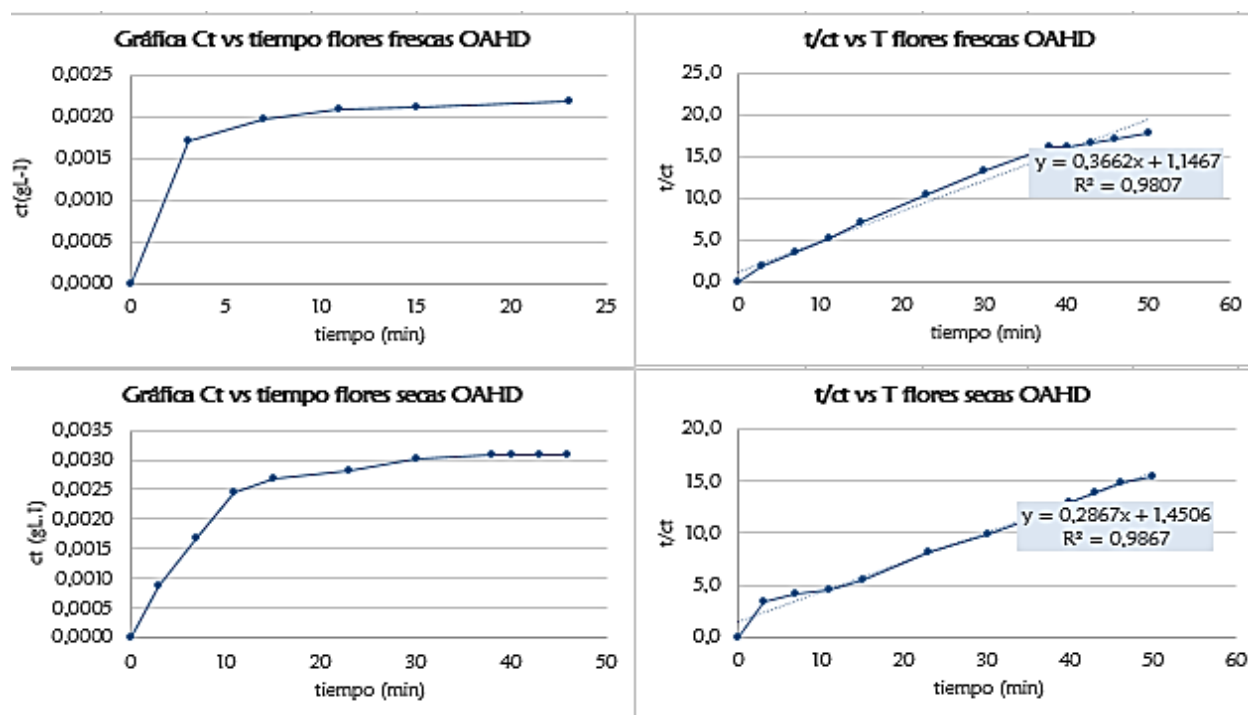


Figura 28. Modelamiento de segundo orden, cinética de extracción mediante HD y OAHD

De acuerdo a los resultados que se presentan en la tabla 12, se puede llegar a establecer una relación entre los términos C_s (g/L) y k (constante de velocidad de extracción de segundo orden (L/g min)) con los obtenidos experimentalmente (Rendimiento %v/w y la velocidad de acumulación del aceite mL/min), para confirmar que el proceso de extracción sigue el comportamiento que se describe en el modelo de segundo orden. En la tabla 13 se puede observar que el valor de C_s se expresa en términos de porcentaje para poder establecer una relación entre el rendimiento experimental. Para el método de extracción por HD en flores frescas, el valor modelado es levemente superior al experimental pero estadísticamente no representa una diferencia significativa ($T \leq 0,1861$); en flores secas por el mismo método, el valor de C_s es moderadamente mayor, indicando que en las condiciones en que se realizó la extracción a nivel experimental se pudo haber obtenido un mayor rendimiento, a pesar de esto, el análisis estadístico reporta que el valor experimental y el modelado no representan una significancia ($T \leq 0,1861$). Para el método de extracción OAHD en los diferentes estados de la flor, el análisis estadístico indica que hay diferencias significativas ($T \leq 0,1861$); en el estado de la flor en fresco hay una marcada significancia entre el C_s modelado y el rendimiento experimental ($T \geq 0,1861$), de acuerdo a los hallazgos, se evidencia que se pudo haber obtenido un mayor rendimiento de aceite esencial, estas diferencias pueden tener su explicación a eventos

adversos que se presentaron durante el proceso de extracción en el OAHD, como las pérdidas de aceite por volatilización (por ejemplo, aumento de la temperatura en el colector de la trampa de Clevenger). En el caso de las flores en estado seco por el mismo método (OAHD), el valor C_s modelado es inferior al obtenido experimentalmente, esto hace que exista una diferencia significativa entre los valores ($T \geq 0,1861$), se esperaba que el modelo matemático aplicado direccionara un valor de C_s superior a 1.2847 % v/w; dentro de la argumentación es importante relacionar que durante la obtención de las fracciones de aceite por unidad de tiempo, en la fase experimental se pudieron haber acumulado cantidades de aceite de extracciones anteriores, dando así una mayor cantidad de aceite, traslapando el verdadero valor del rendimiento %v/w experimental. En conclusión se puede decir que los datos experimentales para el rendimiento (%v/w) están de acuerdo en un 75% a los que se describen en el modelamiento matemático para C_s .

El análisis que relaciona la comparación de la velocidad de acumulación de aceite (mL/min) frente al valor de k modelado, para el método de extracción HD tanto para flor fresca como seca indica que no hay diferencias significativas ($T \leq 0,0157$), por lo tanto es de esperarse que en las condiciones de la experimentación se obtenga entre 0.0200-0.0266 mL de aceite por minuto, cuando se utiliza flores frescas, y una cantidad de aceite 0.0059-0.0069 mL de aceite esencial por minuto. Para las extracciones por OAHD, el análisis estadístico indica que hay diferencias significativas entre la velocidad de acumulación del aceite modelada y la experimental ($T \geq 0,0157$). El valor de k para cada uno de los estados de la flor registra que se acumula menor cantidad de aceite que la que se registró a nivel experimental, estos hallazgos indican que se debe seguir trabajando hasta optimizar la forma de recolección de las muestras de aceite por unidad de tiempo. En conclusión se puede decir que los datos experimentales de velocidad de acumulación del aceite (mL/min) están de acuerdo en un 50% a los que se describen en el modelamiento matemático para k .

7.4 Consumo energético

Existen métodos de extracción que requieren de una gran cantidad de energía para realizar el proceso (debido a los largos tiempos que requiere) entre ellos se encuentra la HD, por lo cual en la actualidad se han venido investigando e impulsando nuevos métodos de extracción amigables con el medio ambiente, debido al uso racional de los recursos renovables y no renovables que se

ha venido proponiendo en los últimos años a nivel mundial, a causa del calentamiento global y la disminución de los recursos naturales.

En Tabla 16 y tabla 17 se presentan los cálculos del consumo energético de cada método de extracción. Para los datos de la tabla 16, se puede observar que el método de mayor consumo es la HD (1.091 Kw/h 1ml y 3.491 Kw/h 1ml) y que el OAHD representa el método que menos energía consumió (0.070 Kw/h 1ml y 0.257 Kw/h 1ml), esto constituye que el OAHD al usar flores frescas de *caléndula officinalis L.*, se redujo en un 93.6% el consumo energético frente a la HD al usar el mismo estado de la flor; también se evidencia una marcada reducción al aplicar el OAHD usar flores seca de *caléndula officinalis L.* en un 92.6% frente a la DH. De acuerdo a la revisión de la literatura, en los aportes expuestos por Gavahian, M., *et al.* (2015), el consumo energético en el OAHD puede oscilar en 0.135 kWh/ml EOs y la HD convencional de 0.689 kWh/ml EOs; en los trabajos de Abdelhadi, *et al.* (2015), para una HD frente una extracción por microondas libre de solventes (SFME) se evidencio que la HD requiere un mayor consumo de energía (0.26 kWh en comparación con 4.0 kWh de la HD). Aunque los cálculos energéticos no concuerdan con los reportados en la literatura, se puede inferir que el método de extracción OAHD es mejor que el HD aplicada.

7.5 Caracterización preliminar del aceite esencial.

7.5.1 Descripción física del aceite esencial de *calendula officinalis L.*

En la figura 29 se presentan los aceites obtenidos por cada uno de los métodos y estados de la flor obtenidos en la experimentación, en la tabla 13 se presentan los resultados de la caracterización preliminar del aceite esencial, donde se indica primero una caracterización física (olor , color y consistencia) y se presentan los resultados para la densidad, índice de refracción e índice de acidez obtenidos para cada uno de los estados y métodos de extracción.

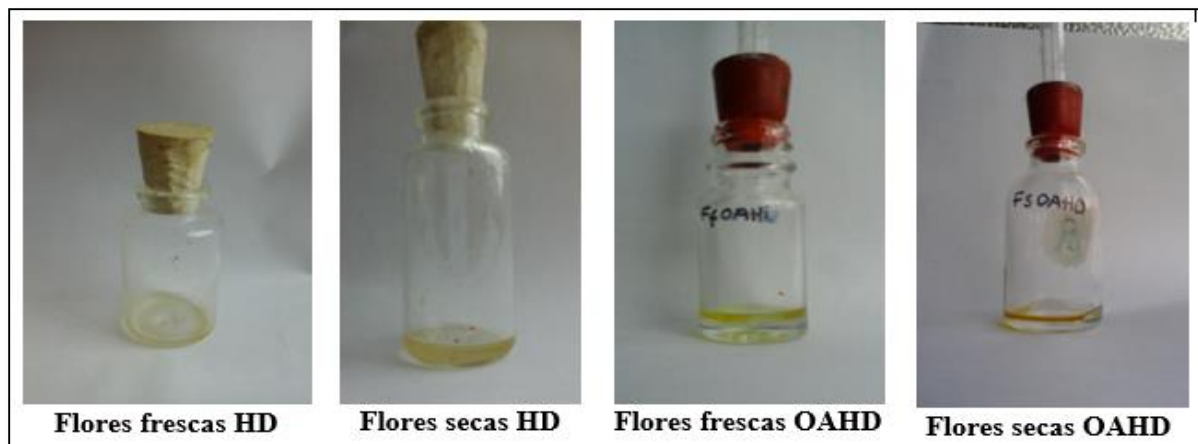


Figura 29. Aceite esencial obtenido por diferentes métodos de extracción

7.5.2 Densidad

La densidad obtenida en la experimentación para el aceite esencial de *calendula officinalis* L. por el método de HD con el estado de la flor fresco fue de 0,885 ml/g y del aceite obtenido por el mismo método pero en flores secas fue de 0,8864 ml/g. Para los obtenidos mediante el método de OAHD en flores frescas fue de 0,8330 ml/g y flores secas estuvo en 0,8540 ml/g. La densidad según Perez, (2014) y estudios reportados de la Universidad Industrial de Santander (UIS), indican que a partir de esta prueba se puede deducir de que está compuesto el aceite esencial, para valores de densidad $> 1\text{g/cm}^3$ tienen fenoles y estéres y para valores $< 1\text{g/cm}^3$ el aceite está compuesto por monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos; de estos últimos estarían compuestos los aceites esenciales de *calendula officinalis* L. obtenidos en la experimentación por los dos métodos de extracción y estados de la flor. En los estudios de Castellanos, (2014) , la densidad de un aceite esencial no es constante, y, depende de varios factores como la madurez de la planta, método de extracción , purificación, y edad del aceite, en esta misma referencia, se indica que los aceites esenciales tienen una densidad en el rango de 0.84 g/mL y 1.2 g/mL, si se llega el caso de obtener un aceite esencial en un rango superior es debido a que los compuestos que se encuentran en mayor proporción en el aceite esencial son fenoles. En la revisión de la literatura son casi nulas las publicaciones sobre estas determinaciones para aceite esencial de *calendula officinalis* L., otros autores referencian densidades de aceites esenciales obtenidos de otras plantas como, Stanojević, L. et al. (2011), en

aceite esencial de flores de *Lavandula officinalis* L., posee una densidad de 0.890 g/cm³; Fernández, *et al.* (2012) en aceite esencial *Pinus caribaea* Morelet var. *Caribaea*, la densidad relativa fue de 0,9020 g/mL; en Castellanos. (2014), reportó un valor de densidad 0,8666 g/mL. Los resultados obtenidos en la experimentación oscilan en un rango entre 0.8330 g/mL y 0.8864 g/mL, y son altamente homogéneos (CV= 0.019), además se encuentran entre los valores reportados por la literatura, y a la densidad relativa del aceite esencial de caléndula que se adquirió de manera comercial como patrón para algunas mediciones (0,865 g/mL-0,885 g/mL).

7.5.3 Índice de refracción

Para el aceite obtenido por HD en flores frescas de *calendula officinalis* L, registró un n_{20} de 1,4880 y el obtenido a partir de flores secas un n_{20} 1,3935. Para el aceite obtenido por OA HD en flores frescas de *calendula officinalis* L, registró un n_{20} 1,3810; en flores secas un n_{20} de 1,3920. El promedio de los datos es confiable (CV= 0.128) para indicar que cada muestra de aceite obtenido registra el índice de refracción reportado. El índice de refracción permite medir la pureza de una sustancia para su identificación, caracterización y asegurar que cumpla con ciertos parámetros al tener un patrón de comparación. Al relacionar los resultados obtenidos en la experimentación del aceite esencial de *calendula officinalis* L. obtenido por HD en flores frescas se encuentra en el rango que indica Castellanos. (2014); este autor argumenta que los aceites esenciales que tienen índices de refracción en un rango entre 1.46 y 1.61 a 20°C, se consideran de buena calidad, como podría ser el caso de las muestras de aceite obtenidas por el método de HD, los demás resultados, están por debajo de este rango, como también del aceite esencial de caléndula que se adquirió de manera comercial (n_{20} 1.462 – 1,472) indicando contaminación de las muestras por la presencia de sustancias extrañas como agua proveniente de la extracción. Dado al bajo número de publicaciones sobre estas determinaciones para aceite esencial de *Calendula officinalis* L, se reportan resultados de investigaciones de otras especies vegetales en donde se han obtenido aceites esenciales, por ejemplo, la investigación expuesta por Cárdenas, (2012) presenta índices de refracción de diferentes aceites esenciales entre los que se encuentran el de pétalos de rosa (n_{20} 1.4570-1.4630), eucalipto (n_{20} 1.4580-1.4700) y cilantro (n_{20} 1.4625-1.4645); al compararlos los resultados obtenidos en la

experimentación se evidencia que sólo las muestras de aceites obtenidas por HD en flores frescas están en el rango de la literatura.

7.5.4 Índice de acidez

Se considera un índice químico dentro del control de calidad de los aceites esenciales. En la medición se cuantifica el número de ácidos grasos libres que se tenga en la muestra. El índice de acidez (Ia) del aceite obtenido por HD a partir de flores frescas y secas de *caléndula officinalis* L., registran en promedio 0.68 mg.KOH/g con un coeficiente de variación de 9.11, indicando que el valor obtenido para cada una de las muestras es descriptivo para la caracterización preliminar del aceite esencial. Estos resultados están dentro de rango que reporta Mejia, (s.f) para el aceite esencial de Romero (0,77 mg.KOH/g); son superiores a los reportados por: Palomino E. & Calderón E. (s.f) para el aceite esencial de *psidium caudatum* (0,4 mg.KOH/g) ; por Gil, E & Saez, A (2000) para el aceite esencial de cardamomo (0.5890 mg.KOH/g), almendra (0.06 mg.KOH/g) y el de Jazmín (0.93 mg.KOH/g). Lo anterior indica que la composición química de cada aceite y el proceso de obtención pueden condicionar el valor de este parámetro. El índice de acidez (Ia) del aceite obtenido por OAHD a partir de flores frescas y secas de *caléndula officinalis* L., registran en promedio 0.84 mg.KOH/g con un coeficiente de variación de 0.0625, indicando que el valor obtenido para cada una de las muestras es confiable para la caracterización preliminar del aceite esencial y para indicar que hay un aumento entre los valores obtenidos por el método HD ; este aumento en el I.A se relaciona en el contenido de ácidos grasos libres que se pudieron formar por hidrolisis del enlace éster de los acilglicéridos presentes en cada uno de los aceites, ocasionado por efecto térmicos y/o hidrolíticos a los que fueron sometidas la muestras en el OAHD, argumento que se relaciona con lo expuesto por Perez, V. (2014), en donde indica que la determinación del índice de acidez representa una gran importancia debido a que en la mayoría de procesos de degradación en extracción del aceite esencial, son catalizados por medios acuosos en las cuales ocurren una serie de reacciones de varios tipo (hidratación, deshidratación e hidrolisis) con lo cual se ve afectado el índice de acidez de la sustancia.

7.5.5 Contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/mL}$) del aceite esencial de *calendula officinalis* L

De acuerdo a los resultados de la tabla 14 y los de la figura 30, se observa que en flores secas (dejando constante el método de extracción), se llega a duplicar la concentración de fenoles totales; este comportamiento puede ser explicado a partir de la argumentación que exponen Ospina, *et al.* (2015), en donde relaciona que los procesos de secado del material vegetal puede generar variabilidad en la composición química de los aceites esenciales. Estos eventos se pueden explicar desde el contexto de las transformaciones químicas sobre los constituyentes del aceite (Memarzadeh, *et al.*, 2015), en donde a partir de nuevos mecanismos químicos se pueden formar nuevos compuestos por reacciones de oxidación, glicosidación, esterificación, entre otros, que pueden potencializar la actividad bioactiva de aceite esencial, como fue el caso del aumento en la concentración porcentual de compuestos como el neral, limoneno, carvona y geraniol en procesos de secado de *Lippia* (familia Verbenaceae) según Ospina, *et al.* (2015). De acuerdo a lo anterior, se hace necesario la formulación de diseños experimentales que conduzcan a identificar la composición química de la flor fresca y seca de *caléndula officinalis* L. y del aceite obtenido mediante los métodos HD y OAHD, para validar que el proceso de secado puede aumentar el contenido de estructuras fenólicas y que pueden dar lugar a indicar que el aceite esencial de *calendula Officinalis* L. a partir de flores secas puede ser considerado como potencial antioxidante contra las especies reactivas de oxígeno.

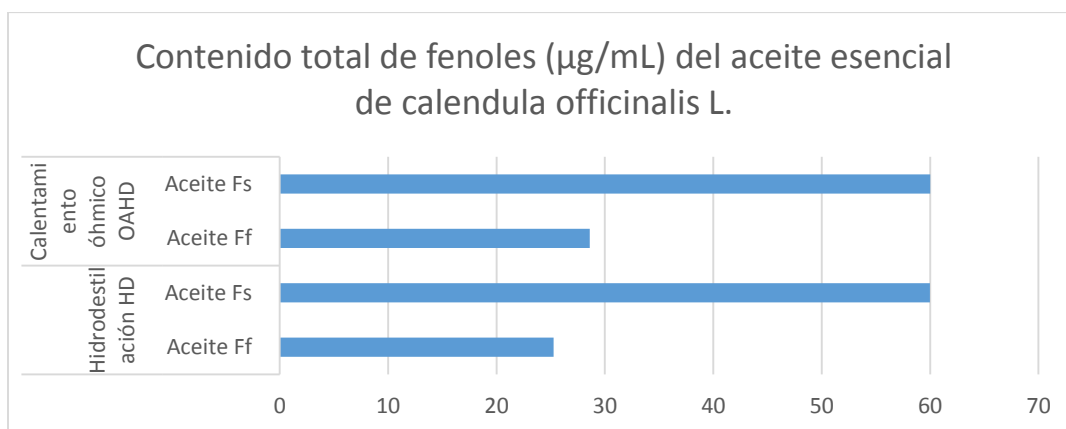


Figura 30. Histograma contenido de fenoles aceite esencial de Caléndula por diferentes métodos de extracción.

El análisis de varianza (ANOVA) indica que se obtiene el mismo contenido de fenoles del aceite esencial de *caléndula officinalis* L. cuando éste es obtenido por HD en flores frescas

(25.25 $\mu\text{g/mL}$) e OAHD en flores frescas (28.6 $\mu\text{g/mL}$) a un valor de $p \geq 0.05$; análisis estadístico que coincide con el reportado en la prueba de Tukey ($T \leq 14.56$). Esta misma tendencia se observa en los tratamientos para los aceites obtenidos por la HD en flores frescas (59.98 $\mu\text{g/mL}$) e OAHD flores secas (60.02 $\mu\text{g/mL}$) a un valor de $p \geq 0.05$; la comparación de medias mediante el test de Tukey confirma que estos dos tratamientos no son diferentes ($T \geq 14.56$). De lo anterior se puede inferir que a la luz de los resultados obtenidos, para un mismo estado de la flor la cantidad de fenoles presentes en el aceite esencial de *caléndula officinalis* L. es el mismo cuando se emplea cualquiera de los dos métodos de extracción (independiente del método de extracción). Existe significancia estadística ($p \geq 0.05$) entre grupos para el contenido total de fenoles cuando se analiza el efecto combinado entre el estado de la flor y el método de extracción así: tanto el estado de la flor como el método de extracción causan un efecto significativo sobre el contenido de fenoles totales presentes en el aceite esencial: en el aceite obtenido por HD en flores frescas (25.25 $\mu\text{g/mL}$) y en flores secas (60.02 $\mu\text{g/mL}$); en el aceite obtenido por OAHD en flores frescas (59.98 $\mu\text{g/mL}$) y flores secas (28.6 $\mu\text{g/mL}$).

El contenido promedio de fenoles indica que el aceite obtenido por cualquiera de los métodos y estado de la flor es bajo con respecto a los resultados encontrados en Cetkovic. *et al.* (2003), Domínguez, (2009); Braga, *et al.* (2009); Fonseca, *et al.* (2009); Butnariu, M. & Zepa, C. (2012) y Ercetin, T., *et al.* (2012); en relación a lo anterior es imperativo indicar que el método aplicado en la fase experimental determina la presencia de más de un grupo fenol por molécula en el aceite esencial, partiendo de este análisis se relaciona que se cuantificaron estructuras fenólicas de baja polaridad y solubles en la fase lipídica; en la revisión bibliográfica, los resultados son obtenidos en extractos etanólicos de las flores, lo que hace que los resultados experimentales no concuerden con la literatura citada, dado que se cuantifican aquellas estructuras aromáticas hidroxiladas solubles en solventes como etanol, metanol e isopropanol. Son escasas las publicaciones bibliográfica que hay en relación de la medición de la capacidad antioxidante del aceite esencial de *caléndula Officinalis* L., induciendo a un mayor estudio en el tema para futuras publicaciones, incluyendo en ellas la aplicación de métodos más específicos como aquellos que evalúan Transferencia de átomos de hidrógeno –HAT y/o Transferencia de electrones- ET.

CONCLUSIONES

La caracterización de las flores de *calendula Officinalis L.*, permitieron conocer el contenido de humedad y materia seca; información que fue de gran importancia en los cálculo de rendimiento de aceite expresados en porcentaje (ml de aceite esencial/100 gramos de muestra en base seca).

En la investigación se concluye que los parámetros cinéticos específicamente la velocidad del incremento de la temperatura ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$), velocidad de acumulación del aceite (mL/min), el rendimiento (%v/w) frente al tiempo total de extracción son diferentes, se aceptan las hipótesis alternas (H_a). En el método de extracción por OAHD se obtuvieron los mejores resultados tanto para la flor en estado fresco como en estado seco y entre ellos, los obtenidos a partir de la flor de *calendula Officinalis L.*, en estado seco : una velocidad de incremento de la temperatura de $38^{\circ}\text{C}/\text{min}$, rendimiento $1,2847\% \text{v/w}$ a un tiempo total de 45 minutos. Por lo tanto se puede decir que el efecto combinado entre tratamientos y estado de la flor condicionan los parámetros cinéticos.

El proceso de extracción del aceite esencial de flores secas y frescas de *Calendula officinalis L.*, sigue la cinética que se describe en el modelo matemático de segundo orden, por medio del cual se pudo establecer el comportamiento que sigue la extracción del aceite esencial en función del tiempo, y, permitió establecer la concentración máxima de aceite (C_s), la velocidad inicial de extracción (h), concentración de aceite esencial en cualquier momento (C_t) y la constante de extracción de segundo orden (k).

Los datos experimentales para el rendimiento del aceite (%v/w) y velocidad de acumulación del aceite (mL/min) se relacionan en un 75% y 50% respectivamente con los datos obtenidos a partir del modelamiento matemático para C_s y el valor de K .

Con respecto al contenido de fenoles, se puede decir que el estado de la flor condiciona el contenido de los fenoles totales ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada una de las muestras de aceite; para un mismo estado de la flor de *calendula Officinalis L.* no se registraron diferencias significativas, pero sí en el análisis de la interacción estado de la flor -método de extracción. En la investigación se concluye que el proceso de secado (48°C - 50°C) tiene un marcado efecto sobre el desarrollo de estructuras fenólicas sobre las muestras, por lo tanto los métodos de extracción empleados no

registraron efectos sobre el contenido de fenoles de cada una de las muestras de aceite *calendula Officinalis L.*

En comparación con muchas otras técnicas de extracción de aceites esenciales, el OAHD puede ser considerado como una tecnología verde ya que consume significativamente menos energía para funcionamiento. De acuerdo a los hallazgos obtenidos en esta investigación, el consumo de energía se redujo en un 93.6% y 96.6 % cuando se comparó los consumo durante la extracción de flores frescas y secas de *Calendula officinalis L.* por los métodos de HD y OAHD respectivamente.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, las flores de *calendula officinalis* L., tienen un bajo contenido de aceite, en este sentido, se recomienda, para optimización de procesos, trabajar con especies aromáticas que tenga un contenido mayor de aceite esencial para proyectar futuras aplicaciones industriales.

Se recomienda seguir las investigaciones con flores de *calendula officinalis* L., por representar interés a nivel industrial dada a las distintas propiedades que tiene derivadas de su composición química, estas investigaciones deben estar enfocadas hacia el hidrolato o agua floral proveniente del proceso de extracción. Aunque entre los objetivos y alcance de esta investigación no se contempló trabajar con el hidrolato, a éste se le determino el contenido de fenoles totales ($\mu\text{g/ml}$); los resultados indicaron que las muestras de aceite proveniente de flores secas por hidrodestilación puede tener una alta actividad antioxidante, como se evidencia en la siguiente tabla:

Contenido de fenoles totales $\mu\text{g/ml}$	
Hidrolato flores secas	177.434
Hidrolato flores frescas	30.354

Por lo tanto, es promisorio verificar por medio de la academia, la actividad biológica del hidrolato para futuras aplicaciones industriales.

En las propuestas que den continuidad a esta investigación, se recomienda realizar un mayor estudio en cuanto al modelamiento matemático de la cinética de extracción, que permita describir el comportamiento físico de extracción para sólidos orgánicos, en donde se tenga en cuenta la porosidad, tamaño del materia vegetal y la difusividad intracelular de las mismas,

como también cálculos matemáticos que predigan la velocidad de incremento de la temperatura y la duración de transferencia de masa en el sólido para optimizar los procesos de extracción.

En las propuestas que den continuidad a esta investigación, se recomienda seguir lo expuesto por Zeng, *et al.* (2016), donde modificaron el diseño del colector de aceites en la trampa de cleverger para evitar el sobrecalentamiento en el colector, dado que el tiempo que demore la mezcla aceite-agua en el colector se puede registrar la degradación de compuestos volátiles termolábiles, bajar la calidad química del aceite y disminuir los rendimientos esperados.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelhadi M., Meullemiestre, A., Gelicus, A., Hassani, A., Rezzoug, S. (2015). Intesification of Hypericum perforatum l. oil isolation by solvent-free microwave extraction. Chemical Engineering Research and desing , 93, 621-631.
- Abdullabekova, V. Juraeva, A. Azizov, O & Yunusxodjaeva, N. (2014). *Essential Oil of caléndula officinalis*. Uzbekistan: Tashkent pharmaceutical institute.
- Acosta de la Luz, L., Rodríguez, C., & Sánchez, E. (2001). *Instructivo técnico de Caléndula officinalis*. Cuba: Revista cubana de plantas medicinales., 2001. 1 (23). p. 23-27.
- Acosta, L. (2006). *Exploración de las propiedades antimicrobianas de extractos vegetales a partir de Caléndula officinalis y Tropaeolum majus y su uso potencial en la industria de alimentos y cosmética*. Bogotá: Universidad de la sabana.
- Agudelo, C. (2011). *Aprovechamiento agroindustial de la caléndula (Calendula officinalis) mediante la producción de un gel desinflamatorio a partir de celulosa*. . Santiago de Cali: Universidad de San Buenaventura .
- Armijo, J., Vicuña, E., Romero, P., Condorhuamán, C. & Hilario, B. (2012). Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 15 N.º 2 , 2012. Págs. 19-27.
- Abril, A (2008). *Calendula officinalis L. composición propiedades y aplicaciones cosmeticas*. Monografía especialización en ciencia y tecnología en cosmética. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2008.3

Ainsworth, E & Gillespie, K. (2007). *Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent*. Nature Protocols. VOL.2 - N°.4

Aquino, E. (2012). *Efecto de la presión de vapor y tiempo de extracción en el rendimiento y características fisicoquímicas de aceite esencial de cedrón (Aloysia triphylla)*. Perú: Universidad Nacional De Trujillo Facultad De Ciencias Agropecuarias. Disponible en: http://agroind.unitru.edu.pe/investigaciones/tesises/rendimiento_y_caracteristicas_fisicoquimicas_de_aceite_esencial_de_cedron_%28alloysia_triphylla%29.pdf

Barrientos, J., Reina, M., & Chacón, I. (2009). Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. *rev.colomb.cienc.hortic.* vol.6 no.2.

Berti, M., Wilckens, R., Hevia, F. & Montecinos, A. (2003). Influence of sowing date and seed origin on the yield of capitula of *calendula officinalis* L. during two growing seasons in Chillán. *Agric.Téc.* Vol.63.

Braga, P., Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Falchi, M., Bertelli, A., Morelli, R & Lo scalzo, R. (2009). Antioxidant Activity of *Calendula officinalis* Extract: Inhibitory Effects on Chemiluminescence of Human Neutrophil Bursts and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Pharmacology* Vol. 83, No. 6, pag. 348-355.

Butnariu, M. & Zepa, C. (2012) Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal* 2012, **6**:35.

Blumrosen, G., Abazari, A., Golberg, A., Yarmush, M., Toner, M. (2016). Single-step electrical field strength screening to determine electroporation induced transmembrane transport parameters . *Biochimica et Biophysica Acta*. 1858, 2041, 2049. Bampouli, A. K. (2014). *Comparison of*

different extraction methods of Pistacia lentiscus var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 81-91

Boukroufa, M. B. (2015). *Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. Ultrasonics Sonochemistry, 72-79*

Castellanos, M. (2014). *Determinación de los compuestos volátiles en Pentacalia vaccinioides, su estudio antioxidante y antimicrobiano. Bogotá: Pontificia universidad Javeriana.*

Cerpa C., (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Valladolid, España. Universidad de Valladolid.

Cetkovic, G., Djilas, S., Canadanovic, J., & Tumbas, V. (2003). Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.). *University of Novi Sad, Novi Sad (Serbia and Montenegro). Faculty of Technology*

Campo Rivera, J. (2012). *Cultivos de caléndula serán más productivos. UN periódico. Disponible en: <http://www.unperiodico.unal.edu.co/en/dper/article/cultivos-de-calendula-seran-mas-productivos.html>*

Cadena Productiva de Plantas aromáticas, medicinales y condimentarias (PAMC). (2008). *Informe Final: análisis de desempeño, Implementación de las herramientas del sistema de inteligencia tecnológica y análisis prospectivo. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.*

Castro, D. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. Rionegro-Antioquía: Universidad Católica Oriente.*

- Duran, V., Matic, M., Jovanovic, M., Mimica, N., Gajinov, Z., Poljacki, M., & Boza, P. (2005). Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *International Journal of Tissue Reactions-Experimental and Clinical Aspects*, 27, 101–106.
- Damyeh, M., Niakousari, M. (2016). Impact of ohmic-assisted hydrodistillation on kinetics data, physicochemical and biological properties of *Prangos ferulacea* Lindl. essential oil: Comparison with conventional hydrodistillation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 387 – 396. Recuperado de: www.elsevier.com/locate/foodsci
- Domínguez, L. (2012). *Efecto de la aplicación del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula (calendula officinalis) en la estabilización del color y vida útil en pulpa de frutas*. Bogotá: Universidad nacional de Colombia.
- Darvishi, H., Khostaghazadeh, Najafi, G. (2013). Ohmic heating of pomegranate juice: Electrical conductivity and pH change. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12, 101-108. Recuperado de www.ksu.edu.sa
- Damyeh, M. & Niakousari, M. (2015). *Impact of ohmic-assisted hydrodistillation on kinetics data, physicochemical and biological properties of Prangos ferulacea Lindl. essential oil: Comparison with conventional hydrodistillation*. Iran: Elsevier. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 33 (2016) 387–396
- Dimas, C., & Dimas S. (2015). Essential oils in foods: extraction, stabilization and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29-35

- Fernández, J., Molina, G., Cánovas, B., Swanson, B. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. *Arbor Revistas*, 168(661), 155-170. Recuperado de <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/827/834>
- Filly, A. F. (2014). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs. *Food Chemistry*, 193-198.
- Fonseca, Y., Dias, C., Vicentini, F., Nomizo, A., Gerlanch, R & Vieira, M. (2009). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>
- Flores, M. (2010). *Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso. Análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo*. Chile. Universidad de Chile
- Fuentes, V., Lemes, C., Reyes, M., Mendez, G., Alonzo, J., & Rodriguez, A. (2000), comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L. *Revista Cubana de plantas medicinales*, 2000. 5 (1). 14-16p.
- Fonnegra, R. Jimenez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* pag 72-75. Editorial universidad de Antioquia. Disponible en <https://books.google.com.co/books?id=K8eI-7ZeFpsC&pg=PA72&dq=usos+aceite+esencial+cal%C3%A9ndula&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjE5t30yrTMAhXGmx4KHfHOD0gQ6AEIGjAA#v=onepage&q=usos%20aceite%20esencial%20cal%C3%A9ndula&f=false>
- Gazim, Z., Rezende, C., Fraga, S., Dias, B., Nakamura, C., & Garcia, D (2008). Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* vol.44 no.3 São Paulo July/Sept. 2008

Gil, E. & Sáez, A. (2000). *Obtención del aceite esencial de cardamomo*. Medellín: Universidad EATFIT

Gil, E., & Sáez, A. (2005). Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía “cero emisiones”. (Cuaderno de investigaciones ISSN 1692-0694). Medellín. Universidad Eafit.

Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., Majzoobi, M (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional Hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 14, 85-91.

Gavahian, M., Farahnaky, A., Farhoosh, R., Javidnia, K., & Shahidi, F. (2015). Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. Food and Bioprocess Technology, 94, 50-58. Recuperado de www.elsevier.com/locate/fbp

Gonzalez, A. (2004) *Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt Biocomercio Sostenible disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Comercio.pdf>

Importadores de aceites esenciales en el 2015 según el Centro de comercio internacional. Tomado de: Lista de los países importadores para el producto seleccionado en 2015. Producto: 33 Aceites esenciales y resinoides; preparaciones de perfumería, de tocador o de cosmética, de: http://www.trademap.org/tradestat/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3||||33||2|1|1|1|1|2|1|1

- Kusuma & Mahfud (2016). Comparision of conventional and microwave hidrodestilation of essential oil of Pogostemon Cablin leaves: analysis and modelling of heat and mass transfer. Indodesia: Institut Teknologi Sepuluh. Department of chemical engineering.
- Lastra, H. & Piquet, R. (1999). *Calendula officinalis L.* Artículo de revisión. Revista cubana de farmacia., 1999. 33 (3). p. 188-194.
- Loescher, C., Morton, D., Razic, S & Kustrin, S. (2014) High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*—Advantages and limitations. Elsevier. Vol. 98, Pages 52–59.
- Man, H., Hamzah, M., Jamaludin, H & Abidin, Z. (2012). Preliminary study: Kinetics of oil extraction from Citronela Grass by Ohmic heated hidro Distillation. SciVerse ScienceDirect. Procedia 3. 124-128.
- Méndez, G, García,J. Santellano, M. Durán, L & Silva, R. (2015) *aceite de orégano sobre la calidad de pechuga de pollos de engorda*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Investigación y Ciencia, vol. 23.
- Memarzadeh, S., Pirbalouti, A., Adibnejad, M. (2015). Chemical composition and yield of Essential oils from Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) under different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 809-816.
- Miguel Gordo, M. (2015). *Aspectos químicos y bioactivos de tres matrices naturales: Calendula officinalis L., Mentha cervina L. y Macrolepiota procera (Scop.) Singer*. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

Mohsen, G., Javidnia, & Majzoobi, M (2012) Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Elsevier. Vol.14, Pages 85–91.

Muñoz, L. (2004). *Plantas medicinales españolas calendula officinalis* L. (Asteraceae). España: Universidad de Salamanca

Moreno, J., López, G & Siche, R. (2012). Modeling and optimization of extraction process of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus globulus*). Perú. Scientia Agropecuaria 1(2010) 147 – 154

Moreno, Y., Hernández, A., Jiménez, L., Serrano, V., & Sánchez, C. (2012). Color en cálices de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. México. Revista chapingo serie horticultura, Vol.18, núm.3, septiembre-diciembre, 2012, pp.395-407.

Montgomery, D. (2000). Design and analysis of experiments. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Muley, B., Khadabadi, S & Banarase, N. (2009). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. Tropical journal of pharmaceutical research, October 2009; 8 (5): 455-465.

Okoh, O. Sadimenko, A. Asekun, O & Afolayan, A. (2008). *The effects of drying on the chemical components of essential oils of calendula officinalis* L. Africa: African Journal of Biotechnology. Vol 7 (10)

Ospina, J., Sánchez, M & Bonilla, C. (2015), Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia origanoides* Kunth accessions. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.

Paolini, J., Barboni, T., Desjobert, J.-M., Djabou, N., Muselli, A., & Costa, J. (2010). *Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation inessential oils of Calendula arvensis L.* Francia: Elsevier Ltd.

Plazas, E. (2011). *Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción*. Bogotá: Jardín botánico de Bogotá, José Celestino Mutis.

Palma, M. (2014). *Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de caléndula (Calendula officinalis L.) y descriptores varietales*. Montecillo, México: Colegio de postgraduados.

Paolini, J., Barboni, T., Desjobert, J.-M., Djabou, N., Muselli, A., & Costa, J. (2010). *Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation inessential oils of Calendula arvensis L.* Francia: Elsevier Ltd.

Paladino S. (s.f). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera L.)* disponible en: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf

Palomino E. & Calderón E. (s.f). Estudio fitoquímico del aceite esencial de *Psidium Caudatum* McVaugh. Revista Colombiana de ciencias químico-farmacéuticas.

Périno, S., Ginies, Ch., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation,

steam and hydrodistillation. Journal of Chromatography A, 1305, 41-47.

Perez, V. (2014) *caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de myrcia amazonica dc. (myrtaceae)*. Santarém, Pará. Universidad federal do oeste de Pará.

Preethi, K. Kuttan, G. & kuttan R.(2006). *Antioxidant potential of an extrac of caléndula officinalis flowers in vitro and in vivo*. India: Amala Cancer Research Center.

Pommier P., Gomes, F., Sunyach, M., D'Hombres, A., & Montbarbon X. (2004) Phase III randomized trial of calendula officinalis compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. J Clin Oncol 2004;22(8):1447-53.

Pereira, R., Rodrigues, R., Genisheva, Z., Oliveira, H., Freitas, V., Texeira, J., & Vicente, A. (2016). Effects of ohmic heating on extraction of food-grade phytochemicals from colored potato. Portugal. Elservier-Foodscience and technology, 493-503

Qi, X., Li, T., Wei, Z., Guo, N., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., FU, Yu., Peng, X. (2014). Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pealeaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] And evaluation of its antimicrobialactivity. Industrial Crops and Products. 58, 322-328. Recuperado de www.elsevier.com/locate/indcrop

Rios, J., Fernández, E., Mínguez, M., & Pérez, A (2007). Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. Elservier. Food Chemistry 106 (2008) 1145-1153.

- Rodríguez, M., Alcaráz, L., Real, S. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México. 38 p
- Rodriguez, E. & Julio, M. (2011). *Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial extraído de la candia (hibiscus escuelentus) aplicada a la conservación de hamburguesas de res*. Cartagena: Universidad de Cartagena.
- Sark, M. & Liu, S (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). Elsevier. Renewable and sustainable Energi reviews 39, 262-269.
- Stanojevic, L., Radulovic, N., Djokic, T., Stankovic, B., Ilic, D., Cakic, M., Nikolic, V. (2015). The yield, composition and hydrodistillation kinetics of the essentialoil of dill seeds (*Anethii fructus*) obtained by different hydrodistillation techniques. Industrial Crops and Products, 65, pp. 429-436.
- Sui, X., Liu T., Ma, Ch., Yang,L., Zu Y., Zhang, L., Wang Hua. (2012). Microwave irradiation to pretreat rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oil simultaneously. Food Chemistry, 131, 1399-1405.
- Salomé. L. Soto, R. Cruz, N. & González, V. (2015). *Chemical composition of scented extracts obtained from calendula officinalis by three extraction methods*. México: Colegio de Postgraduados. *Botanical Sciences* 93, 633-638.
- Sánchez, D. Contreras, J. Nevárez, G & Aguilar, C. (2015) *Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano*. [CyTA - Journal of Food](#) Volume 13, 2015 - [Issue 1](#)

- Sarkis, J., Domeneghini, G., Tessaro, I., Damasceno, L. (2013). Evaluation of key parameters during construction and operation of an ohmic heating apparatus. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 145-154.
- Schmid, D. & Zulli, F (2003). Penetration and Metabolims of Isoflavones in Human Skin, *Cosmetics y Toiletries. Cosmetics & toiletries.*, 2003. 118 (9). p. 1-4
- Szakiel, A.; Ruszkowski, D.; Janiszowska, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. –structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochemistry Reviews.*, 2005. 4 (2-3). p. 151-158.
- Sánchez, Rivera & Carballo., (2010). Biopesticides influence on the quality parameters of *Calendula officinalis* L. and *Matricaria recutita* L. *Rev Cubana Plant Med* v.15 n.2
- Siemeonov, E., Tsibranska, I., (1999). Solid–liquid extraction from plants — experimental kinetics and modelling. *Elservier*. Vol. 73, Issue 3, June 1999, Pages 255–259.
- Stanojevic, L., Radulovic, N., Djokic, T., Stankovic, B., Ilic, D., Cakic, M., Nikolic, V. (2015). The yield, composition and hydrodistillation kinetics of the essentialoil of dill seeds (*Anethii fructus*) obtained by different hydrodistillation techniques. *Industrial Crops and Products*, 65, pp. 429-436.
- Tosun,G. Yayli,B. Arslan, T. Yasar,A. Karaoglu, A. & Yayli, N. (2011). Comparative Essential Oil Analysis of *Calendula arvensis* L. Extracted by Hydrodistillation and Microwave Distillation and Antimicrobial Activities. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 24, 1955-1958
- Vidal, A & Montes, R.(2012). Aplicación de métodos de conservación para alargar la vida útil de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L. Asteraceae) y su posterior uso gastronómico. *Lacadonia*, año

- Viuda, M. (2014). Conferencia: Aceites esenciales, un potencial para alimentos funcionales. *Universidad Miguel Hernández*. España: Grupo de Investigación en productos agroalimentarios de origen vegetal. Instituto de Biotecnología Agroalimentaria
- Yanar, Y., Büyükcıpar, H., Yanar, M & Göcer, M. (2007). Effect of carotenoids from red pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. *Elsevier, Food chemistry* 100 (2007) 326-330.
- Zeng, Q., Zhao, J., Wang, J., Zhang, X., Jiang, J. (2016). Comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *Cirsium japonicum* Fisch. Ex DC and *Cirsium setosum* (Willd.) M.Bieb. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 595-605.

ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLOS DE LABORATORIO PARA LA CARACTERIZACIÓN MATERIA PRIMA

1.1 DETERMINACION DE HUMEDAD Y MATERIA SECA (AOAC, 1990)/ 964.22.

Materiales: Crisoles o cápsulas de porcelana: se deben desecar a 100°C x2h, tomar con pinzas de crisol y registrar el peso vacío.

Procedimiento: Para la determinación de la humedad se pesan aproximadamente 5.0 g de muestra en una balanza de precisión dentro de una cápsula previamente tarada, desecándose a 110°C en estufa, hasta alcanzar un peso constante. La pérdida de peso se considerada como el contenido de humedad y el residuo desecado del alimento se considera la materia seca. Los resultados obtenidos se expresan porcentualmente.

Cálculos:

$$\%H = \left(\frac{\text{gramos de agua}}{b} \right) * 100$$

Donde b la masa (g) de la muestra tomada para el análisis

Gramos de agua= $m(\text{alimentos})_{\text{inicial}} - m(\text{alimentos})_{\text{seco}}$

Porcentaje de Materia Seca:

$$\%MS = m(\text{alimentos})_{\text{seco}} * 100 / b$$

Porcentaje de Materia Seca:

$$\%MS = m(\text{alimentos})_{\text{seco}} * 100 / b$$

1.2 DETERMINACION DE CENIZAS TOTALES Método directo (A.O.A.C., 923.03, 1990).

Materiales

1. Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg
2. Crisoles o cápsulas de porcelana
3. pinzas para crisol.
4. Desecador con deshidratante adecuado
5. Mufla regulada a 550 ± 25 °C
6. guantes para altas temperaturas.
7. gafas de seguridad
8. tapabocas industrial.
9. Motero con mango
10. placa calefactora.
11. Espátula
12. vidrio reloj

Procedimiento:

- Se debe tener una capsula para mufla previamente tarada y marcada.
- Si la muestra contiene abundante agua pesar una cantidad que contenga de 10 g de
- Muestra, mantenerla sobre un baño de vapor hasta sequedad aparente.
- Homogenizar la muestra lo más fino posible y tomar 2-5 gramos del homogenizado y colocarlos en la cápsula.
- Precalcinar en placa calefactora evitando que se inflame, luego colocar en la mufla e incinerar a 550 °C hasta cenizas blancas o grisáceas
- Pre enfriar en la mufla apagada y luego traspasar a desecador y pesar a temperatura ambiente. Las cenizas que contienen manganeso o hierro pueden presentar cierta coloración.
- Enfriar en desecador y pesar.
- La calcinación termina cuando se tiene peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

m2: masa de la cápsula con las cenizas, en gramos.

m1: masa de la cápsula con la muestra, en gramos.

m0: masa de la cápsula vacía, en gramos.

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

**1.2.1 CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO EN ALIMENTOS.
MÉTODO GRAVIMÉTRICO. Instituto de Salud pública de Chile- PRT-711.02-009**

Materiales

1. Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg
2. Crisoles o cápsulas de porcelana
3. pinzas para crisol.
4. Desecador con deshidratante adecuado
5. Mufla regulada a 550 ± 25 °C
6. guantes para altas temperaturas.
7. gafas de seguridad
8. tapabocas industrial.
9. Motero con mango
10. placa calefactora.
11. Espátula
12. vidrio reloj
13. Guantes de nitrilo.
14. estufa y malla
15. vaso de precipitado de 500 ml.

Reactivos:

Ácido Clorhídrico concentrado
Ácido nítrico 65% p.a.
Nitrato de Plata 0.1 N

Procedimiento:

Pesar previamente el papel filtro.

Tomar las cenizas obtenidas en el procedimiento de cenizas totales. Dejar enfriar la capsula con la ceniza y posteriormente adicionar 25 ml de ácido clorhídrico. Calentar en baño hirviente o maría por 5 minutos.

Filtrar cuantitativamente a través de papel filtro libre de cenizas y enjuagar la capsula y el filtro con agua caliente hasta que el filtrado esté libre de cloruros (comprobar agregando gotas de ácido nítrico y solución de nitrato de plata 0.1 N al filtrado, no debe formarse precipitado ni turbidez lechosa).

Colocar el filtro en la capsula e incinerar en placa calefactora, evitando que se inflame. Calcinar a 550°C, preenfriar en la mufla y luego enfriar en desecador y pesar (m_2) hasta peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

m2: masa de la cápsula con las cenizas insolubles en HCL, en g.

m1: masa de la cápsula con la muestra inicial sin calcinar, en gramos.

m0: masa de la cápsula vacía, en gramos.

Promediar los valores obtenidos y expresar el resultado con dos decimales.

1.2.2 CENIZAS SOLUBLES EN AGUA. AOAC 14th Ed. 31.015; LEES R. 1996, Método C9.**Materiales**

1. Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg
2. Crisoles o cápsulas de porcelana
3. pinzas para crisol.
4. Desecador con deshidratante adecuado
5. Mufla regulada a 550 ± 25 °C
6. guantes para altas temperaturas.
7. gafas de seguridad
8. tapabocas industrial.
9. Motero con mango
10. placa calefactora.
11. Espátula
12. vidrio reloj
13. papel filtro
14. embudos
15. Erlenmeyer de 250 ml.

Procedimiento:

Pesar previamente el papel filtro.

Trasferir las cenizas obtenidas en el procedimiento de cenizas totales (A), en un Erlenmeyer con 25 ml de agua, cubrir con un vidrio de reloj.

Hervir suavemente durante unos 5 minutos, filtrar la mezcla el residuo con agua caliente.

Tomar 25 mL de agua destilada y lavar la capsula cuidadosamente y verter el residuo sobre el papel filtro.

Retirar el papel filtro y transferirlo a la cápsula original de incineración.

Desecar en estufa a 105°C durante 1 hora.

Transferir la cápsula a la mufla e incinerar a 550°C hasta peso constante.

Pesar, anotar como masa de cenizas insolubles en agua (B)

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas solubles en agua} = \frac{(A - B)}{M} * 100$$

A= Ceniza total

B= Ceniza insoluble en agua

C= muestra en gramos

1.3 DETERMINACION DE GRASA (AOAC 1990/ 920.39)

Materiales

- Equipo de extracción soxhlet
- N-hexano
- Papel filtro
- balanza
- horno

Procedimiento: Para la determinación de grasa, por este método, se debe usar muestras deshidratadas. El solvente orgánico, por ebullición, asciende a la parte superior del extractor del equipo soxhlet. Allí se condensa por refrigeración con agua y cae sobre la muestra, regresando posteriormente al matraz por sifón, arrastrando consigo la grasa.

- Pesar el papel filtro, pesar 5 gramos de grasa, colocarlas en el papel filtro.
- Colocar la muestra en el extractor del equipo soxhlet.
- En el balón agregar 250 ml de n-hexano, previamente se ha pesado.
- Calentar suavemente hasta 68-70°C
- El solvente se evapora y luego se condensa y cae sobre la muestra
- Cuando el extractor se llene de n-hexano, retornará al balón, es un primer ciclo o sifón.
- Realizar 4 ciclos, aproximadamente 4 horas.
- Realizar una destilación simple para separar el solvente de la grasa
- Evaporar el residuo de n-hexano en estufa y pesar el balón.

Cálculos:

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso del matraz con grasa} - \text{peso del matraz vacío}}{\text{Gramos de muestra}} * 100$$

1.4 DETERMINACION DE pH método AOAC 981.12 edición 2010

Materiales:

- ✓ Vasos de precipitado de 250 ml
- ✓ Homogeneizador
- ✓ pHmetro
- ✓ Balanza analítica
- ✓ muestra

Reactivos

Solución reguladora de pH 4

Solución reguladora de pH 7

Solución reguladora de pH 10

Procedimiento:

Verificación previa al uso del equipo (pHmetro)

a) Ajustar la temperatura del equipo a 20°C ó $25^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$.

NOTA: La temperatura es un factor muy importante en la determinación de pH, al realizar la compensación de temperatura el equipo realiza ajustes en la pendiente de la curva, por lo que se tendrá diferente pH a diferentes temperaturas. Se debe fijar la temperatura de medición en la muestra y en el equipo a fin de tener mediciones reproducibles.

b) Realizar la verificación al menos en dos puntos utilizando los materiales de referencia. Utilizar como mínimo dos soluciones buffer estándar (pH alrededor de 4 y otra con un pH cercano a 7) o a tres puntos con soluciones buffer pH 4, pH 7 y pH 9 ó 10, de valores 8 con dos decimales) de pH conocidos, a una temperatura de 20°C ó $25^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, dependiendo de la acidez del producto.

c) Revisar el valor de la pendiente ("Slope") del equipo.

Si la pendiente del equipo difiere de los valores reportados por el fabricante del equipo, se debe revisar el electrodo y hacer las correcciones en caso de ser necesario.

d) Enjuagar siempre el electrodo antes de efectuar cada medición, utilizar agua y retirar el exceso; si es posible enjuagar con un poco de la solución que se va a medir.

Interpretación de resultados

Medición de la muestra

Tomar una porción de la muestra ya preparada, mezclar bien con un agitador y ajustar su temperatura a 20°C ó $25^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, la cual debe ser igual a la temperatura a la que fue verificado el equipo medidor de pH.

Sumergir el (los) electrodo(s) en la muestra de manera que cubra perfectamente el diafragma. Medir el pH. Sacar el (los) electrodo(s) y lavar con agua.

NOTA: Para la prueba en serie o lote analítico, verificar la calibración del equipo medidor de pH con una o dos soluciones buffer por lo menos cada 30 min.

El valor del pH de la muestra se lee directamente en el equipo.

1.5 MARCHA FITOQUIMICA CUALITATIVA (*Calle y Jiménez, 2002*)

Cloruro férrico: Se realizó esta prueba para determinar la presencia de fenoles. Los taninos reaccionan con solución acuosa de tricloruro férrico al 1% dando coloración azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del ácido protocatéquico) (*Calle y Jiménez, 2002*) Actividad icitiotoxica, antibacterial y antifungica de polifenoles del extracto en acetato de etilo de miconia coronata

A 0.2 mL de la fracción disuelta en etanol, se agregó una gota de solución de tricloruro férrico. Se empleó ácido tánico al 5% como solución patrón y se compararon los resultados.

Acetato de plomo

Esta prueba se realizó con el fin de identificar fenoles, en caso de haberlos. Los taninos reaccionan con solución de acetato de plomo (Fig. 21), produciendo turbidez o precipitado blanco (*Calle y Jiménez, 2002*).

A 1 mL de solución etanólica de las fracciones se le adicionó 1 mL de solución de acetato de plomo al 10%, y se registraron los resultados.

Gelatina-sal

Los taninos precipitan las proteínas de sus soluciones. Se agregó 1 mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo, 1 mL de solución acuosa de gelatina-sal, y 100 g de cloruro de sodio por litro. Se empleó solución de ácido tánico al 10% como patrón para comparar los resultados (*Calle y Jiménez, 2002*).

Flavonoides:Prueba de Shinoda

Esta prueba se hace para reconocer la existencia de flavonoides, los cuales son anillos de gama benzopirona que reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio (*Calle y Jiménez, 2002*)

a 1 mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo se agregó magnesio en polvo y gotas de ácido clorhídrico. Se utilizó como patrón de reacción el extracto etanólico de las hojas de Rosáce

Prueba cualitativa para leucoantocianidinas

Tomar 2 ml del filtrado en un tubo de ensayo y adicionar 1 ml de ácido clorhídrico concentrado (37%). Calentar en baño maría durante 15 minutos. La aparición de coloraciones rojas es prueba presuntiva de la presencia de leucoantocianidinas en la muestra.

Quinonas

Pesar aproximadamente 0,5 g de material vegetal en polvo en un beaker de 100 ml, adicionar 20 ml de etanol al 95% y calentar en baño maría durante 5 minutos hasta ebullición para realizar la extracción de la muestra, filtrar en caliente, tomar 5ml del filtrado y adicionar aproximadamente 3 ml de H₂SO₄ al

10%, calentar en baño maría, durante 15 minutos hasta ebullición para producir la hidrólisis; enfriar la muestra y realizar la extracción de las quinonas con 5 ml de tolueno (usar el tolueno bajo campana extractora) agitar suavemente sin emulsionar, tomar 2ml de la fase orgánica en un segundo tubo de ensayo, adicionar aproximadamente 1 ml de hidróxido de sodio al 5% en amoníaco al 2%. Luego de agitar se obtiene un color rojo cereza en la capa acuosa, lo que indica presencia de quinonas en la muestra.

ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN INDICE DE REFRACCIÓN ACEITE-HEXANO

Materiales y equipos

Refractómetro

Aceite esencial

hexano

Solución 1:1 acetona agua

Procedimiento

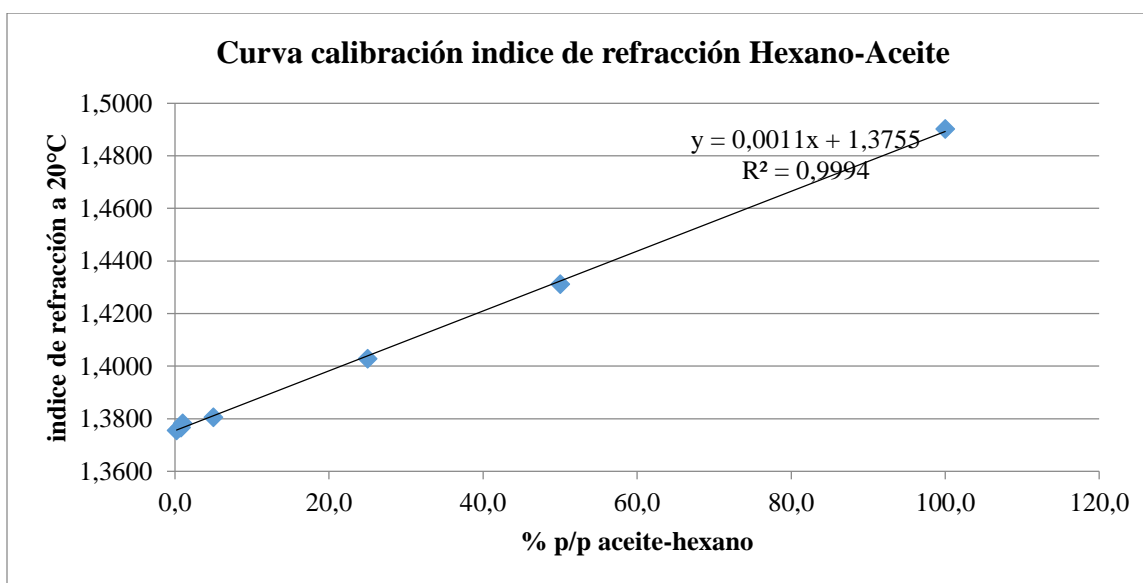
Se debe ajustar la temperatura del refractómetro a 20°C

Se coloca la muestra en los prismas limpios y secos (el prisma se debe limpiar con la solución de acetona-agua 1:1, entre cada medición) y se espera a que se estabilice la temperatura y se efectúa la lectura.

Preparación de la curva de calibración:

Aceite (mL)	% p/p	IR 1	IR 2	IR3	Índice de refracción a 22°C	corrección Índice de refracción a 20°C
0,002	0,2	1,3740	1,375	1,3750	1,3747	1,3755
0,006	0,6	1,3765	1,375	1,3760	1,3758	1,3767
0,008	0,8	1,3755	1,376	1,3760	1,3758	1,3767
0,012	1,0	1,3785	1,378	1,3760	1,3773	1,3782
0,051	5,0	1,3790	1,380	1,3800	1,3797	1,3805
0,250	25,0	1,4050	1,400	1,4010	1,4020	1,4029
0,500	50,0	1,4300	1,428	1,4330	1,4303	1,4312
1,000	100,0	1,4890	1,490	1,4895	1,4893	1,4902

1. Tomar alicuotas de aceite esencial 0.002, 0.006, 0.008, 0.012, 0.051, 0.250, 0.500 y 1.0 mL completar a 1 mL con hexano.
- 1.1 Agregar una muestra de cada uno y tomar el índice de refracción a 20°C (en caso de no ser posible hacer la corrección a dicha temperatura)
- 1.2 Tomar por triplicado el índice de refracción.
- 1.3 Trazar % p/p aceite-hexano contra índice de refracción a 20°C para obtener la Curva estándar.



ANEXO 3 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL DE *Caléndula officinalis L.*

2.1 DETERMINACIÓN DEL INDICE DE ACIDEZ (Aquino Cruzado, E. L. 2012)

Materiales:

- Matraz
- Bureta
- Pipeta
- Pipeteador

Reactivos:

- KOH 0,1N
- Fenolftaleína
- Alcohol-éter neutralizado

Procedimiento:

1. Preparar una solución de KOH al 0.1N
2. Preparar una solución alcohólica de Fenolftaleína al 1%
3. Preparar una solución que consiste en una mezcla de partes iguales alcohol - éter neutralizado
4. En un matraz de capacidad adecuada pesar entre 1 a 2 g de aceite, agregar 60 ml de alcohol - éter, mas tres gotas de fenolftaleína, agitar y valorar con la solución KOH 0.1N hasta coloración ligeramente rosada. Anotar los mililitros gastados y efectuar los cálculos.

Cálculos:

$$\frac{5,61 * V}{P}$$

Donde:

P: el peso, en gramos de la muestra ensayada

V: el volumen en mililitros, de hidróxido de potasio utilizado.

El índice de acidez se encuentra por la siguiente formula y se expresa con un decimal.

2.2 Densidad

La densidad igualmente se tomó por triplicado por el método de diferencia de peso (relación masa volumen). debido a que las muestras de aceite eran muy pequeñas (inferiores a 1ml) como para hacerlo por medio de un picnómetro

2.3 DETERMINACIÓN INDICE DE REFRACCIÓN ISO R 280. "Determination of the Refractive Index of Essential Oils"

Materiales y equipos

Refractómetro

Solución 1:1 acetona agua

Procedimiento

Se debe ajustar la temperatura del refractómetro a 20°C

Se coloca la muestra en los prismas limpios y secos (el prisma se debe limpiar con la solución de acetona-agua 1:1, entre cada medición) y se espera a que se estabilice la temperatura y se efectúa la lectura.

Cálculos

$$IR = F (T_1 - T)$$

En donde:

F = Factor de corrección específico en cada aceite esencial (0.00044)

T = 20°C o la temperatura indicada en la Norma del aceite o producto aromático.

T₁ = Temperatura a la que se efectuó la lectura.

Los resultados se expresan hasta la cuarta cifra decimal

2.4 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES (Paladino S. (s.f)).

MATERIALES:

- ✓ Matraz aforado de 100 ml.
- ✓ Espectrofotómetro (760nm)
- ✓ Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico.
- ✓ Pipetas de 1, 5, 20 y 50 mL.
- ✓ Material usual de laboratorio.
- ✓ Agua destilada.

REACTIVOS:

- ✓ Aceite esencial de oregano.
- ✓ Reactivo Folin-Ciocalteu (se puede preparar con: 100g de tungstato de sodio y 25g de molibdato de sodio, disueltos en 700ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido fosfórico a 85% (densidad =1,71g/ml), 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (densidad = 1,19 g/ml). Poner a ebullición sobre reflujo durante 10 horas, agregar 150g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo y poner nuevamente en ebullición durante 15 minutos. Dejar enfriar y completar a 1 litro con agua destilada.)

- ✓ Acido tánico.
- ✓ Carbonato de sodio 0,7M.

PROCEDIMIENTO:

Preparar las siguientes soluciones

Preparar una disolución 0,7 molar de carbonato sódico

Disolución madre de ácido tánico 500mg/l

Disolución patrón de ácido tánico 50mg/l

Solución de acetona agua 1:1

Preparación de la curva de calibración:

	blanco	1	2	3	4	5	6	7
Sln de ácido tánico	0	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Acetona agua 1:1	0,5	0,45	0,4	0,3	0,25	0,2	0,1	0
Folin Ciocalteu	1	1	1	1	1	1	1	1
Carbonato sódico	4	4	4	4	4	4	4	4
Correspondencia en µg/ml de fenoles	0	5	10	15	20	25	30	35

1. Tomar alícuotas de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 mL de solución de ácido gálico (1 mL = 0.1 mg de ácido Gálico)
 - 1.1 Agregar en el orden de la tabla las disoluciones
 - 1.2 Mezclar bien y medir el color después de 30 minutos a 760 nm contra el blanco de agua Destilada.
 - 1.3 Trazar absorbancia contra concentración para obtener la Curva estándar.

Muestra:

1. 0,5 mL de muestra
2. 1 mL de Reactivo Folin-Ciocalteu
3. 4 mL de Carbonato de Sodio 0,7M
4. Agitar para homogenizar
5. dejar reposar por 30 minutos.
6. Paralelamente, se prepara un blanco analítico con agua destilada.

7. La absorbancia de la muestra se mide en la oscuridad a una longitud de onda de 765 nm en espectrofotómetro.
8. La determinación de fenoles totales se debe realizar por triplicado.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La ecuación a obtener es del tipo: $y = ax + b$

Dónde:

y= Densidad óptica a 760 nm (Absorbancia)

a= Pendiente de la recta

x= concentración de Acido gálico (mg/L).

b= intercepto.

ANEXO 4. Diseño de experimentos factorial de 2x2 con covariable (tiempo)

	Tratamiento	Replicas	T ₁	Flor fresca	T ₂	Flor Seca
Método de extracción	Hidrodestilación	R ₁	T0min....Tf	R ₁ -HD Ff	T0min....Tf	R ₁ -HD % Fs
		R ₂	T0min....Tf	R ₂ -HD% Ff	T0min....Tf	R ₂ -HD% Fs
		R ₃	T0min....Tf	R ₃ -HD%Ff	T0min....Tf	R ₃ -HD% Fs
	Calentamiento óhmico asistido mediante hidrodestilación	R ₁	T0min....Tf	R ₁ - OAHD % Ff	T0min....Tf	R ₁ -OAHD % Fs
		R ₂	T0min....Tf	R ₂ -OAHD% Ff	T0min....Tf	R ₂ -OAHD % Fs
		R ₃	T0min....Tf	R ₃ - OAHD % Ff	T0min....Tf	R ₃ -OAHD % Fs

ANEXO 5. Diseño de experimentos factorial de 2x2, contenido de fenoles totales (FT):

Aceite esencial <i>calendula officinalis</i> L.	Tratamiento		Replicas	Flor fresca	Flor Seca
	Aceite esencial <i>calendula officinalis</i> L obtenido mediante (A) Hidrodestilación HD		R ₁	R ₁ -AHD% Ff	R ₁ -AHD%Fs
			R ₂	R ₂ -AHD% Ff	R ₂ -AHD%Fs
			R ₃	R ₃ -AHD%Ff	R ₃ -AHD%Fs

Aceite esencial <i>calendula officinalis</i> L obtenido mediante (B) Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación COHD	R ₁	R ₁ -A OAHD %Ff	R ₁ -A OAHD %Fs
	R ₂	R ₂ -A OAHD %Ff	R ₂ -A OAHD %Fs
	R ₃	R ₃ -A OAHD %Ff	R ₃ -A OAHD %Fs

ANEXO 6. Resultados de la caracterización de la materia prima *caléndula Officinalis* L.

Replicas	%humedad Ff	%humedad Fs	Materia seca	% cenizas totales (A)	% cenizas HCl	% cenizas con agua	% grasa	pH flor de caléndula
R1-% Ff	86.14277	28.7647	15.1044	10.1881	2.3511	29.8727	11.8384	5.44
R2-% Ff	86.45729	29.5175	14.6421	10.4575	0.9804	36.2506	16.3656	5.46
R3-% Ff	86.86263	30.5345	14.2265	10.2007	1.1706	32.9182	10.0200	5.45
R4-% Ff	86.36273	29.0293	14.8781	10.5769	1.2821	29.1026	6.0533	5.52
R5-% Ff	86.44542	29.2788	14.7683	9.4400	1.2000	14.8664	9.9133	5.51
R6-% Ff	85.69714	27.1992	15.7505	10.5344	1.1832	15.7147	9.6400	5.44
R7-% Ff	85.80000	27.6962	15.4895	9.5975	1.7028	16.4710	9.4667	5.55

ANEXO 7. Resultado de las medidas de tendencia central de la caracterización de la materia prima *caléndula officinalis* l.

	% humedad Ff	% humedad Fs	Materia seca	Cenizas totales	Cenizas insolubles en agua	Cenizas en HCl	% grasa	pH
Recuento	7	7	7	7	7	7	7	7
Promedio	86.253	28.860	14.980	10.142	25.028	1.410	10.471	5.481
Desviación Estándar	0.4060	1.1227	0.5173	0.4542	9.0507	0.4700	3.1184	0.0445
Coefficiente de Variación	0.47%	3.89%	3.45%	4.48%	36.16%	33.33%	29.78%	0.81%
Mínimo	85.6971	27.1992	14.2265	9.44	14.8664	0.9804	6.0533	5.44
Máximo	86.8626	30.5345	15.7505	10.5769	36.2506	2.3511	16.3656	5.55
Rango	1.1655	3.3353	1.5240	1.1369	21.3842	1.3707	10.3123	0.1100
Sesgo Estandarizado	-0.0800	-0.1961	0.2095	-0.8975	-0.1352	1.8028	0.9915	0.6290
Curtosis Estandarizada	-0.3266	-0.1361	-0.2508	-0.5443	-1.2595	1.3921	1.3302	-0.8568

ANEXO 8. Resultados rendimiento de extracción del aceite esencial *caléndula Officinalis L.* mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación

	Tiempo (min)	Rendimiento %v/w ff	Rendimiento %v/w fs		Rendimiento %v/w Ff	Rendimiento %v/w Fs
Método de extracción hidrodestilación	0	0.000	0.0000	Método de extracción Calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación	0,0057	0,0042
	3	0.000	0.0000		0,0855	0,0223
	7	0.000	0.0000		0,2260	0,0413
	11	0.000	0.0000		0,9327	0,2557
	15	0.0333	0.0245		1,2499	0,3428
	19	0.0895	0.0489		1,2499	0,4545
	23	0.1686	0.0732		1,2499	0,5661
	27	0.2801	0.0975		1,2499	0,6777
	30	0.4240	0.1217		1,2499	0,7893
	34	0.5628	0.1471		1,2499	0,9132
	38	0.6965	0.1738		1,2499	1,0370
	42	0.8251	0.2018		1,2499	1,1609
	45	0.8251	0.2311		1,2499	1,2847
	49	0.8251	0.2642		1,2499	1,2847
	53	0.8251	0.3013		1,2499	1,2847
	57	0.8251	0.3424		1,2499	1,2847
	60	0.8251	0.3873		1,2499	1,2847
	68	0.8251	0.4323		1,2499	1,2847
	75	0.8251	0.4765		1,2499	1,2847
	83	0.8251	0.5193		1,2499	1,2847
	90	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	98	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	105	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	113	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	120	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	128	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	135	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	143	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	150	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	158	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	165	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	173	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847
	180	0.8251	0.5614		1,2499	1,2847

Anexo 9: análisis de varianza (ANOVA) parámetros cinéticos de la extracción del aceite esencial de *caléndula officinalis* L.

Velocidad de incremento T° (°C/min)

Descriptive Statistics Dependent Variable: Velocidad de incremento de la temperatura

Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	HD	5.6567	.10970	3
	OAHD	16.1967	.53144	3
	Total	10.9267	5.78319	6
Flor seca	HD	3.7867	.07024	3
	OAHD	37.9967	1.30791	3
	Total	20.8917	18.75589	6
Total	HD	4.7217	1.02755	6
	OAHD	27.0967	11.97369	6
	Total	15.9092	14.21922	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Velocidad de incremento de la temperatura

F	df1	df2	Sig.
9.013	3	8	.006

a. Design: Intercept + Est + Met + Est * Met

Tests of Between-Subjects Effects Dependent Variable: Velocidad de incremento de la temperatura

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Est	297.904	1	297.904	592.833	.000

Met	1501.922	1	1501.922	2988.850	.000
Est * Met	420.202	1	420.202	836.208	.000
Error	4.020	8	.503		
Total	5261.266	12			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .998)

Pairwise Comparisons

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Velocidad de incremento de la temperatura

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Estado	297.904	1	297.904	1.547	.242
Error	1926.144	10	192.614		
Total	5261.266	12			

R Squared = .134 (Adjusted R Squared = .047)

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Velocidad de incremento de la temperatura

F	df1	df2	Sig.
741.042	1	10	.000

a. Design: Intercept + Met

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Velocidad de incremento de la temperatura

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
--------	-------------------------	----	-------------	---	------

Mét	1501.922	1	1501.922	20.799	.001
Error	722.125	10	72.213		
Total	5261.266	12			

a. R Squared = .675 (Adjusted R Squared = .643)

Test de tukey, Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	59	19,6667	2,3333
Columna 2	3	60	20	1
Columna 3	3	17	5,6667	1,3333
Columna 4	3	7	2,3333	0,3333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	768,9166	3	256,3055	205,0444	6,65112E-08	4,0662
Dentro de los grupos	10	8	1,25			
Total	778,9166	11				

El valor q_{α} de tablas con 3 grupos ,8 gl error, y $\alpha=0.05$ es de 4.04. El valor de HSD es de 2,6078:

HDFf	HDfs	OAHDFf	OADHFfs
------	------	--------	---------

HDFf			
HDfs	0,3333		
OAHDf	14	14	
OADHFs	17	18	3,3333

Velocidad de acumulación de aceite (ml/min)

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Velocidad de acumulación aceite

Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	HD	.20140000	.000300000	3
	OAHD	.08873000	.000000000	3
	Total	.14506500	.061712192	6
Flor seca	HD	.00674000	.000346554	3
	OAHD	.02938000	.000010000	3
	Total	.01806000	.012402377	6
Total	HD	.10407000	.106620067	6
	OAHD	.05905500	.032507334	6
	Total	.08156250	.078741163	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Velocidad de acumulación aceite

F	df1	df2	Sig.
5.075	3	8	.029

a. Design: Intercept + Est + Met + Est * Met

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Velocidad de acumulación aceite

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Est	.048	1	.048	920852.713	.000
Met	.006	1	.006	115681.269	.000
Est * Met	.014	1	.014	261305.368	.000
Error	4.204E-7	8	5.255E-8		
Total	.148	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

Estimates

Dependent Variable: Velocidad de acumulación aceite

95% Confidence Interval

Estado de la flor	Mean	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Flor fresca	.145	.000	.145	.145
Flor seca	.018	.000	.018	.018

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Velocidad de acumulación aceite, 95% de confianza

(I) Estado de la flor	(J) Estado de la flor	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	Lower Bound
Flor fresca	Flor seca	.127*	.000	.000	.127
Flor seca	Flor fresca	-.127*	.000	.000	-.127

Based on estimated marginal means *. The mean difference is significant at the .05 level. b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Método de extracción	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
HD	.104	.000	.104	.104
OAHD	.059	.000	.059	.059

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Velocidad de acumulación aceite

(I) Método de extracción	(J) Método de extracción	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b
HD	OAHD	.045*	.000	.000
OAHD	HD	-.045*	.000	.000

Based on estimated marginal means, *. The mean difference is significant at the .05 level. b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Test de tukey

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	0,0602	0,020066667	3,33333E-09
Columna 2	3	0,02077	0,006923333	4,33333E-10
Columna 3	3	0,2661	0,0887	0
Columna 4	3	0,0879	0,0293	1,80556E-35

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
----------------------------------	--------------------------	---------------------------	----------------------------------	----------	---------------------	-----------------------------

Entre grupos	0,0118	3	0,0039	4164168,45	7	4,13867E-25	4,0662
Dentro de los grupos	7,5333E-09	8	9,4167E-10				
Total	0,0118	11					

El valor qα de tablas con 3 grupos ,8 gl error, y α= 0.05 es de 4.04. El valor de HSD es de 0,00007

	HDFf	HDfs	OAHDff	OADHFfs
HDFf				
HDfs	0,0131			
OAHDff	0,0687	0,0818		
OADHFfs	0,0093	0,0224	0,0594	

RENDIMIENTO HD vs Ff

Univariate Analysis of Variance, Descriptive Statistics

Dependent Variable: Rendimiento % v/w

Flor fresca	Hidrodestilación	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	0	1.249900	.0010000	3
	HD	.825100	.0010000	3
	Total	1.037500	.2326743	6
Total	0	1.267867	.0197041	6
	HD	.693250	.1444372	6
	Total	.980558	.3157681	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Rendimiento % v/w

F	df1	df2	Sig.
.028	3	8	.993

.a. Design: Intercept + Ff + HD + Ff* HD

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Rendimiento % v/w

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ff	.039	1	.039	36850.741	.000
HD	.991	1	.991	938171.688	.000
Ff * HD	.067	1	.067	63774.365	.000
Error	8.447E-6	8	1.056E-6		
Total	12.635	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

RENDIMIENTO HD vs Ff

Univariate Analysis of Variance, Descriptive Statistics

Dependent Variable: Rendimiento % v/w

Flor seca	Hidrodestilación	Mean	Std. Deviation	N
Flor seca	OAHD	1.285833	.0011060	3
	HD	.561400	.0010000	3
	Total	.923617	.3967896	6
Total	OAHD	1.267867	.0197041	6
	HD	.693250	.1444372	6
	Total	.980558	.3157681	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Rendimiento % v/w

F	df1	df2	Sig.
---	-----	-----	------

.028	3	8	.993
------	---	---	------

a. Design: Intercept + Fs + HD + Fs * HD

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Rendimiento % v/w

	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fs	.039	1	.039	36850.741	.000
HD	.991	1	.991	938171.688	.000
Fs * HD	.067	1	.067	63774.365	.000
Error	8.447E-6	8	1.056E-6		
Total	12.635	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

RENDIMIENTO OAHD vs Ff

Univariate Analysis of Variance, descriptive Statistics

Dependent Variable: % rendimiento.

Flor fresca	Calentamiento óhmico	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	0	1.1009	.00067	3
	OAHD	.8945	.00036	3
	Total	.9977	.11307	6
Total	0	1.2178	.12803	6
	OAHD	.8882	.00690	6
	Total	1.0530	.19261	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Squarend

F	df1	df2	Sig.
1.117	3	8	.398

a. Design: Intercept + Ff + OAHD + Ff * OAHD

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: % rendimiento.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ff	.037	1	.037	68891.719	.000
OAHD	.326	1	.326	612070.788	.000
Ff * OAHD	.046	1	.046	85467.682	.000
Error	4.260E-6	8	5.325E-7		
Total	13.713	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

RENDIMIENTO OAHD vs Fs

Univariate Analysis of Variance, Descriptive Statistics

Dependent Variable: % rendimiento.

Flor seca	Calentamiento óhmico	Mean	Std. Deviation	N
Flor seca	0	1.3346	.00119	3
	OAHD	.8819	.00038	3
	Total	1.1083	.24799	6
Total	0	1.2178	.12803	6
	OAHD	.8882	.00690	6
	Total	1.0530	.19261	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: % rendimiento.

F	df1	df2	Sig.
1.117	3	8	.398

a. Design: Intercept + Fs + OAHD + Fs * OAH

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: % rendimiento.

Source	Type III Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
Fs	.037	1	.037	68891.719	.000
OAHD	.326	1	.326	612070.788	.000
Fs * OAHD	.046	1	.046	85467.682	.000
Error	4.260E-6	8	5.325E-7		
Total	13.713	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

Test de tukey

Análisis de varianza de un factor
RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	4	3,3004	0,8251	6,6667E-07
Columna 2	4	2,2456	0,5614	6,6667E-07
Columna 3	4	4,9996	1,2499	6,6667E-07
Columna 4	4	5,1389	1,284725	6,69167E-07

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad (valor P)</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,4597	3	0,4866	729162,38	7,99E-32	3,4903
Dentro de los	8,01E-06	12	6,67E-07			

grupos		
Total	1,4597	15

El valor q_{α} de tablas con 3 grupos, 12 gl error, y $\alpha = 0.05$ es de 3.77. El valor de HSD es de 0,00178:

	HDFf	HDfs	OAHDff	OADHFfs
HDFf				
HDfs	0,2637			
OAHDff	0,4248	0,6885		
OADHFfs	0,4596	0,7233	0,0348	

Tiempo total extracción (min)

T-Test

Group Statistics

Tempo total de extracción (min)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Flor fresca	6	66.00	26.291	10.733
flor seca	6	30.00	16.432	6.708

Independent Samples Test

t-test for Equality of Means- 95% Confidence Interval of the Difference

		Std. Error Difference	Lower	Upper
Tempo total de extracción (min)	Equal variances assumed	12.657	7.798	64.202
	Equal variances not assumed	12.657	7.047	64.953
	assumed			

T-Test, Group Statistics

		Método extracción	de N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Tempo extracción (min)	total de	HD	6	28.50	14.789	6.037
		OAHD	6	67.50	24.648	10.062

Independent Samples Test- t-test for Equality of Means

			df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
Tempo extracción (min)	total de	Equal variances assumed	10	.008	-39.000
		Equal variances not assumed	8.187	.010	-39.000

Oneway Descriptives

Tempo total de extracción (min), 95% Confidence Interval for Mean

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Flor fresca	6	66.00	26.291	10.733	38.41	93.59
flor seca	6	30.00	16.432	6.708	12.76	47.24
Total	12	48.00	28.113	8.116	30.14	65.86

Descriptives, Tempo total de extracción (min)

Minimum	Maximum
---------	---------

Flor fresca	42	90
flor seca	15	45
Total	15	90

ANOVA, Tiempo total de extracción (min)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3888.000	1	3888.000	8.090	.017
Within Groups	4806.000	10	480.600		
Total	8694.000	11			

Oneway, Descriptives Tempo total de extracción (min), 95% Confidence Interval for Mean

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum
HD	6	28.50	14.789	6.037	12.98	44.02	15
OAHD	6	67.50	24.648	10.062	41.63	93.37	45
Total	12	48.00	28.113	8.116	30.14	65.86	15

ANOVA

Tiempo total de extracción (min)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4563.000	1	4563.000	11.046	.008
Within Groups	4131.000	10	413.100		
Total	8694.000	11			

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Tiempo total de extracción (min) , 95% Confidence Interval for Difference^a

		Mean				
(I) Flor fresca	(J) Flor fresca	Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	Lower Bound	Upper Bound
Flor fresca	flor seca	36.000	.000	.	36.000	36.000
flor seca	Flor fresca	-36.000	.000	.	-36.000	-36.000

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

ANEXO 10. Medidas de tendencia central parámetros cinéticos.

Estado de la flor y método	Incremento de la temperatura				Tiempo total de extracción				Duración de la extracción			
	Ff HD	Fs HD	Ff OAH D	Fs OAH D	Ff HD	Fs HD	Ff OAH D	Fs OAH D	Ff HD	Fs HD	Ff OAH D	Fs OAH D
Recuento	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
promedio	20	20	6	2	42	90	15	45	22	70	9	43
Desviación estándar	1,25	0,82	0,94	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	0,82	0,94	0,47
curtosis	4,58	4,83	0,87	-3,33	5	5	5	5	4,70	4,99	3,38	4,99
Máx.	21	21	7	3	42	90	15	45	24	71	10	43
mín.	18	19	5	2	42	90	15	45	21	69	8	42
coeficiente de variación	6,24	4,08	15,71	23,57	0,00	0,00	0,00	0,00	5,67	1,17	10,48	1,10

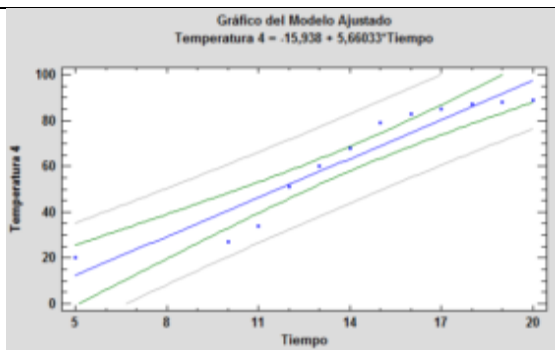
Rango	3	2	2	1	0	0	0	0	3	2	2	1
--------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ANEXO 11. Incremento de la temperatura de la extracción del aceite esencial *caléndula Officinalis* L. mediante hidrodestilación y calentamiento óhmico asistido por hidrodestilación

HIDRODESTILACIÓN (HD)			CALENTAMIENTO ÓHMICO ASISTIDO MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN (OAHD)			
Flores frescas		flores secas	Flores frescas		flores secas	
Tiempo (min)	temperatura (°C)	temperatura (°C)	Tiempo (min)	temperatura (°C)	Tiempo (min)	temperatura (°C)
5	20	16	0	19	0	20
10	27	26	1	25	0,2	35,5
11	34	28	2	33,25	1	41
12	51	30	3	52,25	1,3	75
13	60	34	4	81	1,4	85
14	68	36	5	95	2	95
15	79	39				
16	83	41				
17	85	45				
18	87	47				
19	88	60				
20	89	88				

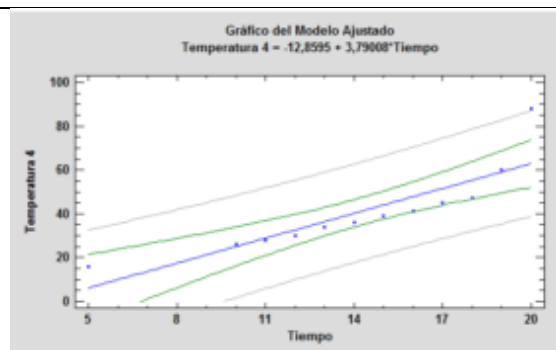
ANEXO 12. Linealización de datos incremento de la temperatura (°C/min)

Flores frescas HD	Flores secas HD
-------------------	-----------------



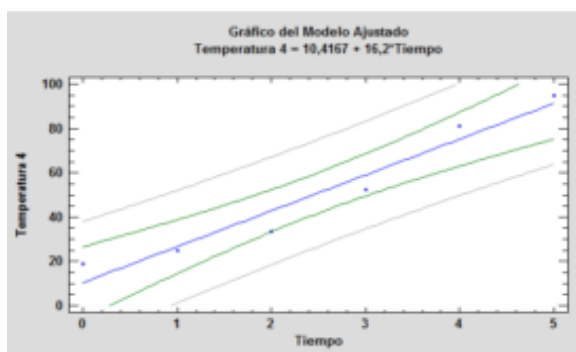
Coefficientes

	Minimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-15,938	8,69493	-1,83302	0,0967
Pendiente	5,66033	0,589572	9,60075	0,0000



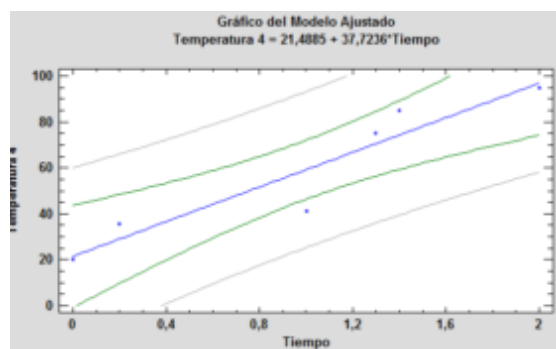
	Minimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-12,8595	10,0837	-1,27528	0,2310
Pendiente	3,79008	0,683736	5,5432	0,0002

Flores frescas OAH



	Minimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	10,4167	5,83372	1,78559	0,1487
Pendiente	16,2	1,92682	8,40765	0,0011

Flores secas OAH

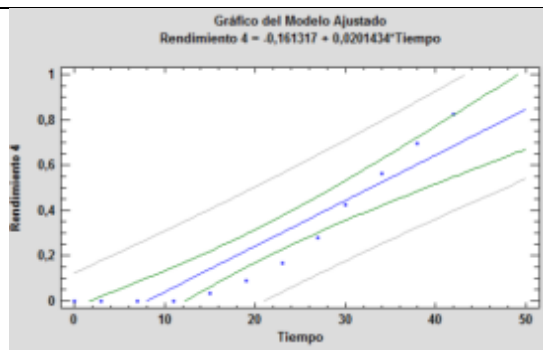


	Minimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	21,4885	8,02644	2,67721	0,0554
Pendiente	37,7236	6,66943	5,65619	0,0048

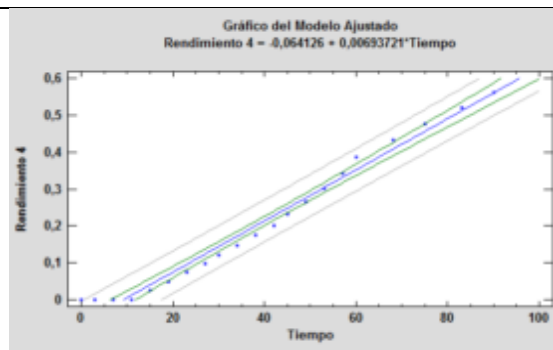
ANEXO 13. Linealización de datos velocidad de acumulación del aceite rendimiento (% v/w) por unidad de tiempo (min)

Flores frescas HD

Flores secas HD

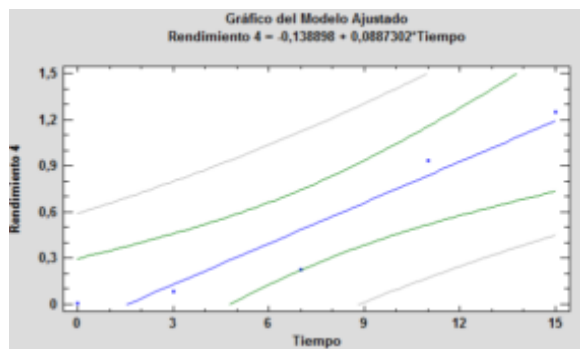


Parámetro	Minimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico t	Valor-P
Intercepto	-0,161317	0,0604618	-2,66807	0,0236
Pendiente	0,0201434	0,00245356	8,20984	0,0000



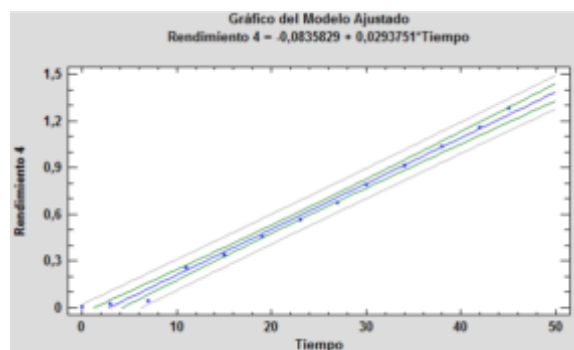
Parámetro	Minimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico t	Valor-P
Intercepto	-0,064126	0,0106207	-6,03782	0,0000
Pendiente	0,00693721	0,000225439	30,772	0,0000

Flores frescas OAH



Parámetro	Minimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico t	Valor-P
Intercepto	-0,138898	0,136914	-1,01449	0,3851
Pendiente	0,0887302	0,0152314	5,82547	0,0101

Flores secas OAH



Parámetro	Minimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico t	Valor-P
Intercepto	-0,0835829	0,0218108	-3,83218	0,0028
Pendiente	0,0293751	0,000814933	36,046	0,0000

ANEXO 14. Análisis de varianza (ANOVA) modelamiento matemático cinética de extracción

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F
Est	Cs modelamiento	.128	1	.128	16.589

	Cs experimental	.039	1	.039	36340.796
Met	Cs modelamiento	1.045	1	1.045	135.365
	Cs experimental	.989	1	.989	912435.139
Est * Met	Cs modelamiento	.024	1	.024	3.105
	Cs experimental	.067	1	.067	61790.281
Error	Cs modelamiento	.062	8	.008	
	Cs experimental	8.673E-6	8	1.084E-6	
Total	Cs modelamiento	13.602	12		
	Cs experimental	12.625	12		

Estado de la flor * Método de extracción

Dependent Variable	Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Error	Lower Bound
Cs modelamiento	Flor fresca	HD	.778	.051	.661
		OAHD	1.457	.051	1.340
	Flor seca	HD	.660	.051	.543
		OAHD	1.161	.051	1.044
Cs experimental	Flor fresca	HD	.825	.001	.824
		OAHD	1.250	.001	1.249
	Flor seca	HD	.561	.001	.560
		OAHD	1.285	.001	1.283

Descriptives Cs experimental, 95% Confidence Interval for Mean, método de extracción.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum
HD	6	.693083	.1446202	.0590410	.541314	.844853	.5604
OAHD	6	1.267317	.0191000	.0077975	1.247272	1.287361	1.2489

Total	12	.980200	.3155991	.0911056	.779678	1.180722	.5604
--------------	----	---------	----------	----------	---------	----------	-------

Descriptives, Cs experimental, 95% Confidence Interval for Mean, estado de la flor

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
Flor fresca	6	1.037500	.2326743	.0949889	.793323	1.281677
Flor seca	6	.922900	.3963697	.1618173	.506935	1.338865
Total	12	.980200	.3155991	.0911056	.779678	1.180722

Descriptive Statistics, Dependent Variable: Cs experimental

Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	HD	.825100	.0010000	3
	OAHD	1.249900	.0010000	3
	Total	1.037500	.2326743	6
Flor seca	HD	.561067	.0011547	3
	OAHD	1.284733	.0010017	3
	Total	.922900	.3963697	6
Total	HD	.693083	.1446202	6
	OAHD	1.267317	.0191000	6
	Total	.980200	.3155991	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Cs experimental

F	df1	df2	Sig.
.126	3	8	.942

a. Design: Intercept + Est + Met + Est * Met

Tests of Between-Subjects Effects, Dependent Variable: Cs experimental

Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Est	.039	1	.039	36340.796	.000
Met	.989	1	.989	912435.139	.000
Est * Met	.067	1	.067	61790.281	.000
Error	8.673E-6	8	1.084E-6		
Total	12.625	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

Pairwise Comparisons, Dependent Variable: Cs experimental, 95% b Confidence, estado de la flor

(I) Estado de la flor	(J) Estado de la flor	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	Lower Bound
Flor fresca	Flor seca	.115*	.001		
Flor seca	Flor fresca	-.115*	.001	.000	-.116

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level. b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Pairwise Comparisons Dependent Variable: Cs experimental, método de extracción

(I) Método de extracción	(J) Método de extracción	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b
HD	OAHD	-.574*	.001	.000
OAHD	HD	.574*	.001	.000

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level. b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Cs modelamiento Group Statistics

	Estado de la flor	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Cs modelamiento	Flor fresca	6	1.117500	.3748139	.1530171
	Flor seca	6	.910867	.2927686	.1195223

	Método de extracción	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Cs modelamiento	HD	6	.719050	.1250219	.0510400
	OAHD	6	1.309317	.1647362	.0672533

		F	Sig.	t	Df
Cs modelamiento	Estado de la flor	3.881	.077	1.064	10

		F	Sig.	t	df
Cs modelamiento	Método de extracción	3.142	.107	-6.991	10

t-test for Equality of Means

PRUEBA DE TUKEY Cs

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	2,333001036	0,777667012	0,002674807
Columna 2	3	1,981344658	0,660448219	0,026088374
Columna 3	3	4,371983645	1,457327882	0,002075537
Columna 4	3	2,738874327	0,912958109	0,003812127
Columna 5	3	2,4753	0,8251	0,000001
Columna 6	3	1,6842	0,5614	0,000001
Columna 7	3	3,7497	1,2499	1E-06
Columna 8	3	3,8542	1,284733333	1,00333E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2,216374673	7	0,316624953	73,0922145	1	2,6571966
Dentro de los grupos	0,069309698	16	0,004331856		-11	
Total	2,285684371	23				

HDFf M-	HDFs M	OAHDFF M	OAHDfs M
0,6745	0,8560		
	0,2525	0,6034	
		0,6913	
0,2805		0,9550	0,3516

2,0918	0,5895	0,2665	0,3369
0,4428	0,6243	0,2317	0,3718

ANALISIS ESTADÍSTICO PARA K

Descriptive Statistics

	Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
K modelamiento	Flor fresca	HD	.026533	.0108611	3
		OAHD	.062667	.0011930	3
		Total	.044600	.0209628	6
	Flor seca	HD	.005900	.0006083	3
		OAHD	.013433	.0113024	3
		Total	.009667	.0082626	6
	Total	HD	.016217	.0132308	6
		OAHD	.038050	.0279078	6
		Total	.027133	.0237402	12
K experimental	Flor fresca	HD	.020067	.0000577	3
		OAHD	.088667	.0000577	3
		Total	.054367	.0375738	6
	Flor seca	HD	.006900	.0000000	3
		OAHD	.029267	.0000577	3
		Total	.018083	.0122508	6
	Total	HD	.013483	.0072118	6
		OAHD	.058967	.0325348	6
		Total	.036225	.0326953	12

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type Sum	III of	df	Mean Square	F
--------	--------------------	----------	--------	----	-------------	---

		Squares			
Est	K modelamiento	.004	1	.004	59.168
	K experimental	.004	1	.004	1579776.333
Met	K modelamiento	.001	1	.001	23.112
	K experimental	.006	1	.006	2482480.333
Est * Met	K modelamiento	.001	1	.001	9.915
	K experimental	.002	1	.002	641256.333
Error	K modelamiento	.000	8	6.187E-5	
	K experimental	2.000E-8	8	2.500E-9	
Total	K modelamiento	.015	12		
	K experimental	.028	12		

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Sig.
Est	K modelamiento	.000
	K experimental	.000
Met	K modelamiento	.001
	K experimental	.000
Est * Met	K modelamiento	.014
	K experimental	.000
Error	K modelamiento	
	K experimental	
Total	K modelamiento	
	K experimental	

. R Squared = .920 (Adjusted R Squared = .890)

Group Statistics K modelamiento

	Estado de la flor	N	Mean	Std. Deviation	Std. Mean	Error
K modelamiento	Flor fresca	6	.044600	.0209628	.0085580	
	Flor seca	6	.009667	.0082626	.0033732	
	Método de extracción	N	Mean	Std. Deviation	Std. Mean	Error
K modelamiento	HD	6	.016217	.0132308	.0054014	
	OAHD	6	.038050	.0279078	.0113933	

Descriptive Statistics Dependent Variable: K modelamiento

Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	HD	.026533	.0108611	3
	OAHD	.062667	.0011930	3
	Total	.044600	.0209628	6
Flor seca	HD	.005900	.0006083	3
	OAHD	.013433	.0113024	3
	Total	.009667	.0082626	6
Total	HD	.016217	.0132308	6
	OAHD	.038050	.0279078	6
	Total	.027133	.0237402	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: K modelamiento

F	df1	df2	Sig.
3.211	3	8	.083

a. Design: Intercept + Est + Met + Est * Met

Pairwise Comparisons, Dependent Variable: K modelamiento

(I) Método de extracción	(J) Método de extracción	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b
HD	OAHD	-.022*	.005	.001
OAHD	HD	.022*	.005	.001

*. The mean difference is significant at the .05 level. b.
Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

K experimental

Group Statistics

	Estado de la flor	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
K experimental	Flor fresca	6	.054367	.0375738	.0153394
	Flor seca	6	.018083	.0122508	.0050014
	Método de extracción	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
K experimental	HD	6	.013483	.0072118	.0029442
	OAHD	6	.058967	.0325348	.0132823

Descriptive Statistics, Dependent Variable: K experimental

Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
Flor fresca	HD	.020067	.0000577	3
	OAHD	.088667	.0000577	3
	Total	.054367	.0375738	6
Flor seca	HD	.006900	.0000000	3
	OAHD	.029267	.0000577	3
	Total	.018083	.0122508	6
Total	HD	.013483	.0072118	6
	OAHD	.058967	.0325348	6

Total	.036225	.0326953	12
-------	---------	----------	----

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: K experimental

F	df1	df2	Sig.
5.333	3	8	.026

a. Design: Intercept + Est + Met + Est * Met

Tests of Between-Subjects Effects, Dependent Variable: K experimental

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Est	.004	1	.004	1579776.333	.000
Met	.006	1	.006	2482480.333	.000
Est * Met	.002	1	.002	641256.333	.000
Error	2.000E-8	8	2.500E-9		
Total	.028	12			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

PRUEBA DE TUKEY PARA K

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	0,07966838	0,026556127	0,000117804
Columna 2	3	0,017747895	0,005915965	4,14135E-07
Columna 3	3	0,188038146	0,062679382	1,4079E-06
Columna 4	3	0,040295691	0,013431897	0,000127532

Columna 5	3	0,0602	0,020066667	3,33333E-09
Columna 6	3	0,02077	0,006923333	4,33333E-10
Columna 7	3	0,2661	0,0887	0
Columna 8	3	0,0879	0,0293	1,80556E-35

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabi lidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,0180	7	0,0026	83,0740	2,2102E-11	2,6572
Dentro de los grupos	0,0005	16	3,0895E-05			
Total	0,01846042	23				

El valor α de tablas con 8 grupos , 16 gl error, y $\alpha= 0.05$ es de 4.90. El valor de HSD es de 0.0157

	HDFf	HDfs	OAHDff	OADHFfs	HDFf	HDfs	OAHDff	OADHFfs
HDFf								
HDfs	0,0206							
OAHDff	0,0361	0,0568						
OADHFfs			0,0492					
HDFf			0,0426					
HDfs	0,0196		0,0558					
OAHDff		0,0828	0,0260	0,0753	0,0686	0,0818		
OADHFfs		0,0234	0,0334	0,0159			0,0594	

ANEXO 15. Resultados del modelamiento cinética de extracción

Flores frescas HD				Flores secas HD			Extracción frescas OAHD				Extracción secas OAHD		
Tiempo (min)	Rendimiento %V/w	Ct	t/ct	Rendimiento %V/w	ct	t/ct	Tiempo (min)	Rendimiento %V/w	ct	t/ct	Rendimiento %V/w	ct	t/ct
0	0,0001	0,00	0,00	0,0014	0,000	0,000	0,000	0,0001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,0006	0,015	2,0	0,0017	0,0058	5,2	3	0,0057	0,0017	1,8	0,011	0,0009	3,4
7	0,0082	0,018	3,9	0,0084	0,0085	8,3	7	0,0912	0,002	3,6	0,028	0,0017	4,1
11	0,024	0,019	5,7	0,013	0,0112	9,8	11	0,3172	0,0021	5,3	0,0474	0,0024	4,5
15	0,0339	0,021	7,2	0,0245	0,0132	11,4	15	1,2499	0,0021	7,1	0,2071	0,0027	5,6
19	0,0895	0,022	8,8	0,0489	0,0145	13,1	23	1,2499	0,0022	10,6	0,4857	0,0028	8,1
23	0,1686	0,022	10,2	0,0732	0,0155	14,6	30	1,2499	0,0023	13,3	0,5705	0,003	10
27	0,2801	0,022	12,1	0,0975	0,0164	16,5	38	1,2499	0,0023	16,2	1,2847	0,0031	12,3
30	0,424	0,023	13,3	0,1217	0,0172	17,5	40	1,2499	0,0025	16,3	1,2847	0,0032	12,5
34	0,5628	0,023	15,0	0,1471	0,0179	19	43	1,2499	0,0026	16,8	1,2847	0,0033	13
38	0,6965	0,023	16,4	0,1738	0,0186	20,2	46	1,2499	0,0027	17,1	1,2847	0,0034	13,4
42	0,8251	0,023	18,2	0,2018	0,0193	21,8	50	1,2499	0,0028	17,8	1,2847	0,0035	14,1
45	0,8251	0,026	17,5	0,2311	0,0199	22,6							
49	0,8251	0,026	17,5	0,2642	0,0205	23,9							
53	0,8251	0,026	17,5	0,3013	0,0211	24,9							
57	0,8251	0,026	17,5	0,3424	0,0216	26,4							
60	0,8251	0,026	17,5	0,3873	0,0221	27,1							
68	0,8251	0,026	17,5	0,4323	0,0226	30,1							
75	0,8251	0,026	17,5	0,4765	0,0231	32,4							
83	0,8251	0,026	17,5	0,5193	0,0236	35,1							
90	0,8251	0,026	17,5	0,5614	0,0242	37,3							
98	0,8251	0,026	17,5	0,5614	0,0247	39,6							

ANEXO 16. Resultados Caracterización preliminar del aceite esencial de *caléndula officinalis* L.

Caracterización del aceite esencial obtenido mediante HD de <i>caléndula Officinalis</i> L.	Replicas	Indice de acidez	Densidad	Indice de refracción
	R1-Ff	0,7480	0,8856	1,4890
	R2-Ff	0,6233	0,8861	1,4895
	R3-Ff	0,6857	0,8859	1,4895
	R1-Fs	0,70125	0,8864	1,3935

	R2-Fs	0,74554	0,8865	1,3855
	R3-Fs	0,62005	0,8866	1,3860
Caracterización del aceite esencial obtenido mediante OAHD de caléndula Officinalis L.	Replicas	Indice de acidez	Densidad	Indice de refracción
	R1-Ff	0,8330	0,8893	1,381
	R2-Ff	0,8330	0,8891	1,381
	R3-Ff	0,8330	0,8890	1,380
	R1-Fs	0,8540	0,8879	1,392
	R2-Fs	0,8540	0,8875	1,391
	R3-Fs	0,8540	0,8879	1,391

ANEXO 17. Resultado de las medidas de tendencia central de la caracterización de la materia prima caléndula Officinalis L.

Flores frescas hidrodestilación:

Resumen Estadístico

	<i>Indice de acidez</i>	<i>Densidad</i>	<i>indice de refracción</i>
Recuento	3	3	3
Promedio	0,685667	0,885867	1,48933
Desviación Estándar	0,06235	0,000251661	0,000288675
Coefficiente de Variación	9,09334%	0,0284085%	0,0193828%
Mínimo	0,6233	0,8856	1,489
Máximo	0,748	0,8861	1,4895
Rango	0,1247	0,0005	0,0005
Sesgo Estandarizado	-0,00170114	-0,41407	-1,22474
Curtosis Estandarizada			

Flores secas hidrodestilación

Resumen Estadístico

	<i>Indice de acidez</i>	<i>Densidad</i>	<i>indice de refracción</i>
Recuento	3	3	3
Promedio	0,688947	0,8865	1,38833
Desviación Estándar	0,0636433	0,0001	0,00448144
Coefficiente de Variación	9,23776%	0,0112803%	0,322793%
Mínimo	0,62005	0,8864	1,3855
Máximo	0,74554	0,8866	1,3935
Rango	0,12549	0,0002	0,008
Sesgo Estandarizado	-0,592143	3,53278E-12	1,20762
Curtosis Estandarizada			

Flores frescas calentamiento óhmico

Resumen Estadístico

	<i>Indice de acidez</i>	<i>Densidad</i>	<i>Indice de refracción</i>
Recuento	3	3	3

Promedio	0,833033	0,889133	1,38067
Desviación Estándar	0,000057735	0,000152753	0,000288675
Coeficiente de Variación	0,0069307%	0,0171799%	0,0209084%
Mínimo	0,833	0,889	1,3805
Máximo	0,8331	0,8893	1,381
Rango	0,0001	0,0003	0,0005
Sesgo Estandarizado	1,22474	0,6613	1,22474
Curtosis Estandarizada			

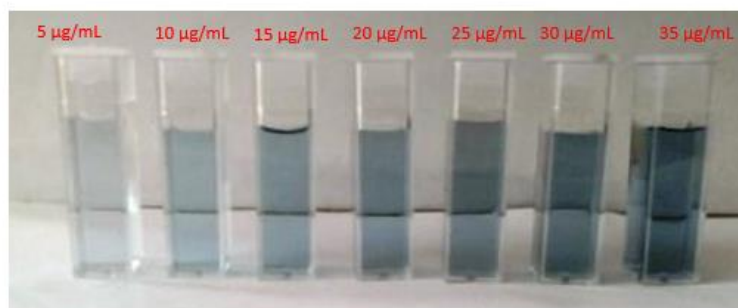
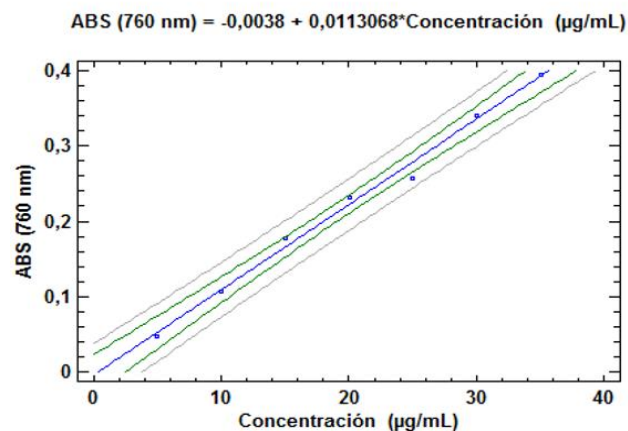
Flores secas calentamiento óhmico

Resumen Estadístico

	<i>Indice de acidez</i>	<i>Densidad</i>	<i>indice de refraccion</i>
Recuento	3	3	3
Promedio	0,853	0,887767	1,39267
Desviación Estándar	0,001	0,00023094	0,00208167
Coeficiente de Variación	0,117233%	0,0260136%	0,149473%
Mínimo	0,852	0,8875	1,391
Máximo	0,854	0,8879	1,395
Rango	0,002	0,0004	0,004
Sesgo Estandarizado	0	-1,22474	0,914531
Curtosis Estandarizada			

ANEXO 18. Resultados de la curva patrón contenido de fenoles totales.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	ABS (760 nm)	
0	0,1147	menos el blanco
5	0,1631	0,0484
10	0,2222	0,1075
15	0,29165	0,1769
20	0,347	0,2323
25	0,3713	0,2566
30	0,455	0,3403
35	0,509	0,3943



Figura* curva patrón contenido de fenoles (µg/mL) de ácido tánico

ANEXO 19. Análisis de varianza (ANOVA) fenoles totales (µg/mL)

FENOLES TOTALES

Variable dependiente: fenoles totales (HD Vs Ff)

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: fenoles totales

F	df1	df2	Sig.
2.527	3	8	.131

Prueba la hipótesis nula que el error de la varianza de la variable dependiente es igual en todos los grupos a. Design: Intercept + Ff + HD + Ff * HD

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: fenoles totales (µm/mL)

	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Ff	3635.905	1	3635.905	62.297	.000	.886
HD	.008	1	.008	.000	.991	.000
Ff * HD	31.428	1	31.428	.538	.484	.063
Error	466.915	8	58.364			
Total	27641.626	12				

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: fenoles totales

				95% Confidence Interval	
				Lower	Upper
Flor seca	OAHD	60.023	4.411	49.852	70.195

	HD	63.310	4.411	53.139	73.481
flor fresca	OAHD	28.447	4.411	18.275	38.618
	HD	25.260	4.411	15.089	35.431

Fenoles totals (HD Vs FS)

Univariate Analysis of Variance

Descriptive Statistics Dependent Variable: fenoles totals Vs flor seca-métodos de extracción

Estado de la flor	Método de extracción	Mean	Std. Deviation	N
Flor seca	OAHD	60.023333	5.2915247	3
	HD	63.310000	13.1329814	3
	Total	61.666667	9.1340477	6

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: fenoles totales

Type III Sum of					
Fs	3635.905	1	3635.905	62.297	.000
HD	.008	1	.008	.000	.991
Fs * HD	31.428	1	31.428	.538	.484
Error	466.915	8	58.364		
Total	27641.626	12			
a. R Squared = .887 (Adjusted R Squared = .845)					

Type III Sum of					
Source		df	Mean Square	F	Sig.
Ff	3635.905	1	3635.905	62.297	.000
OAHD	.008	1	.008	.000	.991
Ff * OAHD	31.428	1	31.428	.538	.484
Error	466.915	8	58.364		
Total	27641.626	12			

a. R Squared = .887 (Adjusted R Squared = .845)

Fenoles totales (OAHD Vs Fs)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fs	3635.905	1	3635.905	62.297	.000
OAHD	.008	1	.008	.000	.991
Fs * OAHD	31.428	1	31.428	.538	.484
Error	466.915	8	58.364		
Total	27641.626				

a. R Squared = .887 (Adjusted R Squared = .845)

Prueba de Tukey:

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	75,78	25,26	11,4211
Columna 2	3	179,93	59,9766667	63,0085333
Columna 3	3	85,7	28,5666667	21,4577333
Columna 4	3	180,07	60,0233333	28,0002333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad (valor P)</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3300,586	3	1100,195	35,5223	5,6859E-05	4,066
Dentro de los grupos	247,7752	8	30,9719			
Total	3548,362	11				

El valor q_{α} de tablas con 3 grupos, 8 gl error, y $\alpha = 0.05$ es de 4.53. El valor de HSD es de 14,56:

HDFf HDfs OAHDff OADHFs

HDFf

HDfs	34,73	
OAHDf		31,38
OADHFs	34,77	31,42